

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-222597

(43) 公開日 平成7年(1995)8月22日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		9161-4B		
C 0 7 K 16/18		8318-4H		
C 1 2 N 1/21		8828-4B		
15/09	Z N A	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 有 発明の数 3 O L (全 37 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-241565
(62) 分割の表示 特願昭59-69874の分割
(22) 出願日 昭和59年(1984)4月6日

(31) 優先権主張番号 4 8 3 4 5 7
(32) 優先日 1983年4月8日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 591008029
ジェネンテック・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国カリフォルニア94080、サ
ウス・サン・フランシスコ、ポイント・サ
ン・ブルノ・ブールバード460番

(71) 出願人 594164829
シティ・オブ・ホープ
C i t y o f H o p e
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91010、
デュアート、イースト・デュアート・ロー
ド・1450

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え免疫グロブリンの調製方法

(57) 【要約】

【目的】 細胞処理特性及び／又は抗原結合特性が改良された免疫グロブリンを提供する。

【構成】 予じめ定められた様に変更されている哺乳動物免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖をコードしている配列が挿入された発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、該宿主細胞の培養物から生成物を回収する、変化した免疫グロブリンの調整方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 不変領域および可変領域を有し、免疫グロブリンの重鎖または軽鎖を含んでいる、特定の同定された抗原に対して特異性を有する変化した免疫グロブリンの調製方法であって、(a)特定の同定された抗原に対して特異性を有する変化した免疫グロブリンの重鎖または軽鎖であって、該免疫グロブリンのアミノ酸配列が、少なくとも 1 個のアミノ酸残基の変更、削除または付加により、哺乳動物免疫グロブリンのアミノ酸配列からは、予め定められた様に変更されている重鎖または軽鎖、をコードしている配列からなる DNA 分子を調製し、(b)この配列を、適切なプロモーターに機能的に結合している少なくとも 1 個の複製可能な発現ベクターに挿入し、(c)上記(b)の少なくとも 1 個のベクターで少なくとも 1 個の宿主細胞培養を形質転換し、そして(d)宿主細胞培養から免疫グロブリンを回収することからなる調製方法。

【請求項 2】 予め定められた変更、削除または付加が不変領域部にある請求項 1 に記載の調製法。

【請求項 3】 宿主細胞が細菌宿主細胞である請求項 1 または 2 に記載の調製法。

【請求項 4】 細菌宿主細胞が大腸菌のものである請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の調製法。

【請求項 5】 ベクターが重鎖および軽鎖の両方をコードしている DNA を含んでいる請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の調製法。

【請求項 6】 免疫グロブリンが変化した重鎖、軽鎖、または Fab 免疫グロブリンである請求項 1 ～ 5 に記載の調製法。

【請求項 7】 免疫グロブリンが不溶性粒子として細胞内に蓄積される請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の調製法。

【請求項 8】 成熟重鎖または軽鎖が、細胞溶解次いで、変性剤への溶解により該粒子から回収される請求項 7 に記載の調製法。

【請求項 9】 変化した重鎖または軽鎖が培地中へ分泌される請求項 5 または 6 に記載の調製法。

【請求項 10】 宿主細胞がグラム陰性菌であり、変化した重鎖または軽鎖が宿主細胞菌のペリプラズム空間に分泌される請求項 5 または 6 に記載の調製法。

【請求項 11】 重鎖および軽鎖を回収し、この軽鎖と重鎖を再構成して、特定の既知抗原に対して変化した親和性を有する変化した免疫グロブリンを形成させることからなる請求項 5 ～ 8 のいずれかに記載の調製法。

【請求項 12】 重鎖および軽鎖が同一の宿主細胞中で共に発現される請求項 5 ～ 11 のいずれかに記載の調製法。

【請求項 13】 免疫グロブリン不変領域の起源となった種とは異なった第 2 の哺乳動物種の可変領域の少なくとも 1 個のアミノ酸の置換により、免疫グロブリンの可

変領域が変更される請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の調製法。

【請求項 14】 得られた免疫グロブリンが重鎖あるいは軽鎖であるか、または宿主細胞培養から成熟免疫グロブリンとして回収された Fab 免疫グロブリンである請求項 13 に記載の調製法。

【請求項 15】 第 1 の哺乳動物種がヒトである請求項 13 または 14 に記載の調製法。

【請求項 16】 特定の同定された抗原に対して特異性を有する変化した免疫グロブリンであって、該免疫グロブリンのアミノ酸配列が、少なくとも 1 個のアミノ酸残基の変更、削除または付加により、哺乳動物免疫グロブリンのアミノ酸配列からは、予め定められた様に変更されている、特定の同定された抗原に対して特異性を有する変化した免疫グロブリンの重鎖または軽鎖を含んでいる免疫グロブリンを含有している組成物。

【請求項 17】 免疫グロブリンの可変領域が、免疫グロブリンの不変領域の起源となった種とは異なる第 2 の哺乳動物種の可変領域の少なくとも 1 個のアミノ酸の置換により変更されているものである請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】 免疫グロブリンのアミノ酸配列が、少なくとも 1 個のアミノ酸残基の変更、削除または付加により、哺乳動物免疫グロブリンのアミノ酸配列からは、予め定められた様に変更されている、特定の同定された抗原に対して特異性を有する変化した免疫グロブリンをコードしている DNA であって、プロモーターと機能的に結合した DNA を含有している複製可能な発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】 本発明は、免疫グロブリン産生の分野及び天然に生ずる免疫グロブリンアミノ酸配列の改変に関するものである。詳細には、本発明は、組換え技術を使用して、脊椎動物系に通常見られるものと同類(analogous)である双方の免疫グロブリンを産生すると共に、これら遺伝子改変技術を利用してキメラ型又はその他の改変型を作成することに関するものである。

【0002】 A. 免疫グロブリン及び抗体

抗体は、外来蛋白質、糖蛋白質、細胞又はその他の抗原性外来物質による攻撃に反応して脊椎動物免疫系により産生される特異的な免疫グロブリンポリペプチドである。生物が外来細胞による侵入を克服し或るいは外来物質をその生物系から除去し得る一連の過程は、少なくとも部分的に理解されている。この過程の重要な部分は、特定の外来物質に対して特異的に結合する抗体の製造である。特定抗原に対するこの種のポリペプチドの結合特異性は極めて精巧なものであり、個々の脊椎動物により発生し得る特異性の多様性は著しく複雑で変化に富むものである。多数の抗原が反応を誘発し得るが、それらの反応は殆んどそれを誘発した特定抗原のみに対するもので

ある。

【0003】免疫グロブリンは、上記したような抗体と抗原特異性を欠如した同類の蛋白物質との両者を包含する。後者はリンパ系では低レベルで産生されるが骨髄腫では高レベルで産生される。

【0004】A. 1. 起源及び用途

現在、脊椎動物抗体の2種の主な起源が利用されている:即ち、哺乳動物Bリンパ球による*in situ*生成及びB細胞ハイブリッドによる細胞培養物(cell culture)における生成である。抗体は未熟のBリンパ球がプラズマ細胞(形質細胞)へ分化する結果として*in situ*で生成され、これは特異抗原による刺激に反応して生ずる。未分化のB細胞では、免疫グロブリン鎖上の種々の領域をコードしているDNA部分はゲノムDNA内で隔てられて存在している。これら配列は転写前に順次再配列される。この過程の概略はGough, Trends in Biochem. Sci., 6:203(1981)に記載されている。得られる再配列ゲノムは、成熟Bリンパ球内で発現し所望の抗体を産生することができる。然しながら、単一の抗原のみが特定哺乳動物の免疫系圏内に入る場合でさえ、均一な抗体群が生じるわけではない。特定抗原に対する*in situ*での免疫反応は、抗原に存在する各種決定因子に対する反応のモザイクにより規定される。単一群(single population)のB細胞が相同抗体(homologous antibody)の各サブセットに寄与し、従って*in situ*での抗体の生成は「ポリクローナル」である。

【0005】この限られてはいるが固有の異質性は、多くの特定の場面に、ハイブリドーマ技術を用いて「モノクローナル」抗体を生成させることにより克服された(Kohler et al., Eur. J. Immunol., 6:511(1976))。この方法に於いては、抗原を注射した哺乳動物に由来する脾細胞又はリンパ球を腫瘍細胞系(セルライン)と融合させてハイブリッド細胞即ち「ハイブリドーマ」を作製する。これらハイブリッド細胞は、不滅(永久的に増殖可能)であると共にB細胞の遺伝学的にコードされた抗体を産生することができる。このように生成されたハイブリッドを選択、希釈及び再増殖により遺伝的に単一の株に分離すると、各株は単一の遺伝系を示す。従って、これらは所望の抗原に対し免疫反応性の抗体を産生し、これら抗体は同質であることが確証され、その純粋な遺伝起源(genetic parentage)に基いて「モノクローナル」と呼ばれる。細胞融合技術は現在まで主としてネズミ系の融合に集中しているが、ヒト-ヒトハイブリドーマ(L. Olsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5429(1980))、並びにヒト-ネズミハイブリドーマ(J. Schlom et al., 同上, 77:6841(1980))及びその他数種の異種間ハイブリッド組合せも同様に作成されている。或いは抗体産生一次B細胞(primary B cell)が、ウィルスDNAでの形質転換による*in vitro*で永久株化されている。

【0006】ポリクローナル又は特に好ましくはモノクローナル抗体は、本発明の抗体と同様な多くの有用な性質を有する。例えばこれらは、B細胞ゲノムの初期プロセッシングを誘発する抗原の存在を、この抗原-抗体反応を適当な検出技術、例えば検定(RIA, EMT及びELISA)を可能にする放射性同位元素又は酵素による標識と組合せることによって、検出するための特異的免疫沈澱試薬として使用することができる。このように、抗体は多くの抗原物質に対する免疫診断試験の基礎となる。他の重要な用途において、抗体は問題とする抗原を含有する物質又は有機体による攻撃を受けた対象被検体に直接注射して、この攻撃に対処することができる。この方法は現在その実験段階にあるが、その有力性は明らかである。第3に、全身診断及び処置も可能となる。何故なら、注射された抗体は特定の標的病気組織に指向させられ、従って、これらと共に適当な標識を運ぶことにより病気の存在を決定し、或いは適当な薬剤を運ぶことにより病気組織を攻撃するために使用することができる。

【0007】ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体は、理論的には上記したように有効であり且つその特異性によりポリクローナル抗体よりも明らかに好適であるが、或る種の欠点を有する。第1に、これらはハイブリドーマ(従って、哺乳動物)起源の他の蛋白質及び細胞物質で汚染される傾向がある。これらの細胞は更に、発癌性を高め、発生し又は媒介し得る物質、特に核酸断片を含有し、更に蛋白質断片も含有する。第2に、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ系は不安定な傾向があり、産生される抗体の構造が変化したり、抗体産生が完全に停止したりする(G. Kohler et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:2197(1980); S. L. Morrison, J. Immunol., 123:793(1979))。細胞系ゲノムは、現在その性質が未知であるような刺激に反応してそれ自体で変化(alteration)すると思われ、その結果誤った配列を産生し得る。第3に、ハイブリドーマ及びB細胞は共に或る種の抗体をグリコシル化型で産生することが避けられず(F. Melchers, Biochemistry, 10:653(1971))、これは或る場合には望ましくないものである。第4に、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の産生はいずれも比較的高価である。第5に、恐らく最も重要なことであるが、現在の技術(ハイブリドーマ又はB細胞反応)による産生では、成熟B細胞由来抗原に反応して*in situ*で通常誘発されるものよりも有効な構成成分を有する抗体を産生すべくゲノムを操作することができない。本発明の抗体は上記の欠点をもたず、更に優秀な分子を提供する機会を与える。

【0008】抗体特異性を欠如している免疫グロブリンでさえ、抗体自身よりは小さい範囲の潜在的用途であるが有用である。現在まで理解されたこの種の免疫グロブ

リンの用途としては、グロブリン関連貧血に対する蛋白質補充治療がある。この意味で、抗原に結合し得ないことは実際に有益である。何故ならこれら蛋白質の治療価値はこのような機能により阻害されるからである。現在、この種の非特異性抗体は、適当に誘発された骨髓腫細胞培養物からのみ少量で誘導することができる。本発明は、それに代わる一層経済的な起源を提供する。更に、本発明は四元体(tetramer)の4つの鎖を別々に処理することにより特異性を消却する機会を与える。

【0009】A. 2. 一般的構造特性

脊椎動物系に於ける基本的な免疫グロブリン構造単位は現在十分に理解されている(G. M. Edelman, Ann. N. Y. Acad. Sci., 190:5(1971))。これらの単位は、分子量約23,000ダルトンの2つの同一のLポリペプチド鎖と分子量53,000~70,000の2つの同一なH鎖とから構成されている。これら4つの鎖はジスルフィド結合により「Y」形状で結合され、ここでL鎖は、図1に示すように、Yの口部から出発し分岐領域を通して連続するH鎖を包囲する。「枝」部分は、図に示したようにFab領域と呼ばれる。H鎖は γ , μ , α , δ 又は ϵ として更にこれらのいくつかのサブクラスに分類され、この鎖の性質はこれが長い不変領域を有するためIgG, IgM, IgA, IgD又はIgEとしての抗体の「クラス」を決定する。L鎖は κ 又は λ として分類される。各H鎖のクラスは κ 又は λ のいずれのL鎖とも組合せて作成することができる。L鎖とH鎖とは互いに共有結合され、免疫グロブリンがハイブリドーマ又はB細胞により生成される際に2つのH鎖の「テイル(尾部)」部分は共有ジスルフィド結合により互いに結合される。然しながら、正確な配置に於いて、鎖の非共有結合が起っても、集合体は抗原との反応が同様に可能であり、或いは非特異的免疫グロブリンとして蛋白質補充に有用である。

【0010】アミノ酸配列は、Yの頂部のN-末端から各鎖の底部のC-末端まで延在する。N-末端は、抗体を誘発した抗原に対し特異的で且つ長さ約100個のアミノ酸から成る可変領域であり、この可変領域はL鎖とH鎖との間及び抗体毎に僅かな変動がある。各鎖の可変領域は、鎖の残余の長さに見合って延在する不変領域と結合している。L鎖とH鎖の結合は、ゲノムレベルで見て、約12個のアミノ酸をコードするL鎖遺伝子内の「J」領域として、並びに両方で約25個のアミノ酸をコードするH鎖遺伝子内の「D」領域と「J」領域との組合せとして、現在知られている結合配列を介して生ずるものと思われる。

【0011】鎖の残余の部分は不変領域と呼ばれ、特定のクラス内では、抗体の特異性(即ち、これを誘発する抗原)と共に変化しない。上記したように、5種の主要な公知クラスの不変領域が存在し、これらは免疫グロブリン分子のクラス(H鎖不変領域の γ , μ , α , δ 及び ϵ に

対応するIgG, IgM, IgA, IgD及びIgE)を決定する。不変領域もしくはクラスは、補体の活性化(E.

A. Kabat, "Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry", 第2版, p. 413-436, Holt, Rinehart, Winston(1976))及びその他の細胞反応(D. W. Andrews et al., Clinical Immunology, p. 1-18, W. B. Sanders(1980); S. Kohl et al., Immunology, 48:187(1983))を含め、抗体のその後のエフェクター機能を決定する一方、可変領域はこれが反応する抗原を決定する。

【0012】B. 組換えDNA技術

組換えDNA技術は、遺伝子配列のクローニング及び発現に関する技術が集積されて充分高度な状態に達している。各種のDNA配列をかなり容易に組換えて、形質転換微生物及び細胞培養物に於いて異種蛋白質産物を産生し得る新規なDNA配列を創成することができる。DNAの各種の平滑末端断片又は「粘着(付着性)」末端断片をin vitroで結合して発現ベクターを産生させ且つ生物を形質転換させる一般的手段及び方法が現在使用できる。

【0013】必須要素(即ち、複製のオリジン、1種もしくはそれ以上の表現型選択特性、発現制御配列、異種遺伝子挿入物(インサート))及び残余のベクターのDNA組換えは、一般に宿主細胞の外部で行なわれる。得られる複製可能な組換え発現ベクター即ちプラスミドを形質転換により細胞中へ導入し、多量の組換えベヒクルを形質転換体の増殖によって得る。コードされているDNAメッセージの転写及び翻訳を支配する部分に関し、遺伝子が適正に挿入された場合、得られる発現ベクターは挿入遺伝子がコードするポリペプチド配列を産生するのに有用であり、この過程を「発現」と呼ぶ。得られる産物は、必要に応じ、宿主細胞の溶菌及び適当な精製による他の蛋白質からの産物の回収によって得ることができる。

【0014】實際上、組換えDNA技術の使用は、全く異種のポリペプチドを発現することができ(所謂直接的発現)、或いは同種(homologous)ポリペプチドのアミノ酸配列の一部に融合した異種ポリペプチドを発現することもできる。後者の場合、目的とする生物活性産物は、しばしばそれが細胞外環境で開裂されるまで融合した同種/異種ポリペプチド内で生物不活性にされている。

【0015】遺伝学及び細胞生理学の研究のための細胞もしくは組織培養物並びに微生物系を維持する技術は充分確立されている。単離した細胞から順次トランスファーすることにより作成された永久細胞系を維持するための手段及び方法が使用できる。研究に使用する目的には、この種の細胞系は液体媒体中の個体支持体上に維持され、或いは支持栄養源を含有する懸濁液中での増殖により維持される。大量生産への規模拡大は、単に機械的問題を提起するだけと思われる。

【0016】本発明は、適当な宿主細胞培養物を用いる組換え技術により生成される抗体及び非特異性免疫グロブ

10

20

30

40

50

リン(NSI)に関するものである。これらの抗体及びNSIは、純粋な「モノクローナル」形態で容易に製造することができる。これらをゲノムレベルで処理して互いに異なる種からの相同性(homology)を引き出す変種のキメラを生成することができる。更に、4つの鎖全部を同じ細胞で生成する必要はないので、蛋白質レベルで処理することもできる。従って、多くの「タイプ」の免疫グロブリンが本発明に包含される。

【0017】第1に、哺乳動物B細胞によりin situで又は適当な永続性腫瘍系と融合したB細胞、即ちハイブリドーマにより産生される天然に存在する抗体のアミノ酸配列に類似する免疫グロブリン特に抗体は、組換技術を用いて産生される。第2に、本発明方法により、従来性質が互いに関連するとは思われていなかったポリペプチドから成る免疫グロブリンが産生され、本発明はこのような免疫グロブリンに係る。この種の再編成は、2種以上の抗原を結合し得る「ハイブリッド」抗体を産生するのに特に有用であり、且つ異なる起源のH鎖とL鎖とが実質的に特異性を減弱化する「複合」免疫グロブリンを産生するのに有用である。第3に、遺伝子操作によって、例えば可変領域は1種の哺乳動物モデル系からのアミノ酸配列に対応し、不変領域は他の哺乳動物モデル系のアミノ酸配列に類似するような「キメラ」抗体を生成することができる。更に、これら2種の類似配列は、異なる種から誘導することができる。第4に、遺伝子操作により、特異性及びその他の特性が向上した「改変」抗体を生成することもできる。

【0018】2つの他のタイプの免疫グロブリン様の部分が産生され得る:即ち、標的組織に対するホーミングキャリア(homing carrier)として有用な「単一価(univalent)」抗体及び免疫グロブリン分子の「Fab」領域、即ち「Y」の枝のみを含む「Fab蛋白質」である。これらの単一価の抗体及びFab断片も「哺乳動物性(哺乳動物由来)」とすることができ、即ち哺乳動物由来のアミノ酸配列に類似する。例えば、不変配列パターン及び可変配列パターンが異なる起源であるような哺乳動物鎖もしくはキメラの新規な組立ても可能である。最後に、組換技術により産生されるL鎖もしくはH鎖のみ、或いはその部分のいずれも本発明に包含され、哺乳動物性であってもキメラであってもよい。

【0019】他の面に於いて、本発明は、上記のNSI、抗体及びその部分をコードするDNA並びに適当な宿主細胞に於いてこの種の免疫グロブリンの産生を行ない得る発現ベクター又はプラスミドに向けられる。本発明は、これらベクターにより形質転換して得られる宿主細胞及び細胞培養物も包含する。最後に本発明はこれらNSI及び抗体の製造方法並びにDNA配列、プラスミド及びそれらによる形質転換細胞に向けられる。

【0020】詳細な説明

A. 定義

本明細書中に使用する「抗体」という用語は、特異的免疫反応活性を有する四元体(tetramer)又はその集合体(aggregate)を意味し、通常図1の「Y」形状に合体されたL鎖とH鎖とから成り、これら連鎖の間に共有結合を有し又は持たない。「免疫グロブリン」という用語は、特異的免疫反応活性があるかないかに拘らず、この種の集合体(assembly)又はその一部を意味する。「非特異的免疫グロブリン」(「NSI」)という用語は、特異性を持たない免疫グロブリン、即ち抗体でないものを意味する。

【0021】「哺乳動物抗体」という用語は、鎖のアミノ酸配列がin situで又はハイブリドーマに於いて哺乳動物系により産生される抗体に見られるような配列と相同(homologous)である抗体を意味する。これらの抗体は、不純な形態であるが慣用の系においても生成され得るような抗体に類似する。

【0022】「ハイブリッド抗体」という用語は、鎖が個別に対応の哺乳動物抗体の鎖と相同である新規な集合体を示し、従って2つの異なる抗原が四元体により沈澱し得るような抗体を意味する。ハイブリッド抗体に於いて一方のH鎖とL鎖との対は1つの抗原に対して生じた抗体と相同であり、H鎖とL鎖との他方の対は他の抗原に対して生じた抗体と相同である。この結果、「二価(devalence)」の性質が生じ、即ち2つの抗原に同時に結合する能力が生ずる。勿論、この種のハイブリッドは下記するようなキメラ鎖を用いて生成することもできる。

【0023】「複合(composite)」免疫グロブリンという用語は、H鎖とL鎖とが異なる種の起源又は特異性のものに類似し、従って得られたものが非特異的免疫グロブリン(NSI)になると思われ、即ち抗体特性を欠如すると思われるようなものを意味する。

【0024】「キメラ抗体」という用語は、H鎖とL鎖との各アミノ酸配列の1部が特定種に由来する又は特定クラスに属する抗体の対応配列と相同であり、且つ鎖の残部が他の対応配列と相同であるような抗体を意味する。典型的には、これらキメラ抗体に於いて、L鎖とH鎖との両者の可変領域は哺乳動物の1種に由来する抗体の可変領域に類似し、不変部分は他の哺乳動物に由来する抗体の配列と相同である。この種のキメラ型に対する1つの明らかな利点は、例えば容易に入手し得るハイブリドーマ又はヒト以外の宿主生物由来B細胞を、例えばヒト細胞調製物に由来する不変領域と組合せて使用することにより、現在公知の起源から可変領域を便利に誘導し得ることである。可変領域は製造が容易であるという利点を有し且つ特異性はその起源により影響されないが、不変領域がヒト由来であるために、抗体を注射した場合、ヒト以外の起源に由来する不変領域よりもヒト被験者に対する免疫反応を誘発しにくいと思われる。

【0025】然しながら、この定義はこの特定例に限定されない。即ち、H鎖もしくはL鎖の一方又は双方が異なる起源の抗体の配列に類似した配列の組合せから成る

任意の抗体を包含し、これらの起源は異なるクラスであっても、異なる抗原反応であっても、或いは異なる種の起源があつてもよく、融合点(fusion point)が可変／不変領域の境界に存在するかどうかに関係ない。従つて、不変領域も可変領域も公知の抗体配列に類似しないような抗体を産生することができる。このようにして、例えば可変領域が特定抗原に対しより高度の特異親和性を有するか、又は不変領域が向上した補体固定反応(complement fixation)を誘発させ得るような抗体を作成することができ、或いは特定の不変領域が有する性質を更に改善することができる。

【0026】「改変(変容)抗体(altered antibody)」という用語は、アミノ酸配列が哺乳動物の抗体又はその他の脊椎動物の抗体とは変化している抗体を意味する。本発明に対して組換えDNA技術が適切であるため、天然抗体に見られるアミノ酸の配列に制限する必要はない。抗体を再設計して所望の特性を得ることができる。可能な変化は数多く、僅か1個もしくは数個のアミノ酸の変化から例えば不変領域の完全な再設計に至る範囲とすることができる。一般に、不変領域に於ける変化は例えば補体固定、膜との相互作用及びその他の作用機能のような細胞処理特性(cellular process characteristics)を改良させるために行なわれる。可変領域に於ける変化は、抗原結合特性を改良するために行なわれる。更に、抗体を工学的に処理して「魔法玉(magic bullet)」概念に従つて毒性剤(toxic agent)を特異的に放出する役に立てることもできる。改変(alteration)は標準的組換え技術により行なうことができ、又オリゴヌクレオチド指向突然変異誘発技術(aligonucleotide-directed mutagenesis techniques)によつても行なうことができる(Dalbadie-McFarland et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 79:6409(1982))。

【0027】「単一価の抗体(univalent antibody)」という用語は、第2のH鎖のFc(もしくはステム)領域に結合したH鎖/L鎖ダイマーから成る集合体(aggregate)を意味する。この種の抗体は抗原に対し特異的であるが、特異抗原表面を有する組織を標的とする所望の性質を更に有し、その抗原有効性(antigenic effectiveness)を損うことがなく、即ち抗原変調(antigenic modulation)がない。この点に関する単一価の抗体の現象及び性質はM. J. Glennie et al., Nature, 295:712(1982)に示されている。従来、単一価の抗体は蛋白質分解により形成されていた。

【0028】「Fab」領域とは、H鎖のY枝部分から成る配列に対し、及び全体的にL鎖に対しほぼ均等又は同様(analogous)であり且つ全体(集合体)として抗体活性を有することが示されている鎖の部分の意味する。「Fab蛋白質」(この蛋白質は本発明の一面を構成する)は、1つのH鎖と1つのL鎖との集合体(aggregate)(一般にFab'として知られる)並びに抗体Yの2つの枝部分に対応

する四元体(一般にF(ab)₂として知られる)を包含し、これらはいずれも共有的に又は非共有的に集合される。但し、この集合は特定抗原又は抗原群(antigen family)と選択的に反応することができる。Fab抗体は単一価の抗体と同様に、従来蛋白質分解により生成されており、標的組織に対する抗原変調を誘発しないという性質を有する。然しながら、これらは「エフェクター」Fc部分を欠如するので例えばマクロファージによる標的細胞の溶菌を行なうことができない。

10 【0029】「Fab蛋白質」は、一般的用語「抗体」もしくは「免疫グロブリン」と同様に本発明の定義に従う同様なサブセットを有する。即ち、「哺乳動物」Fab蛋白質、「ハイブリッド」Fab蛋白質、「キメラ」Fab及び「改変(altered)」Fab蛋白質が種々のタイプの抗体につき上記に示した対応の定義と同様に規定される。

20 【0030】勿論、個々のH鎖もしくはL鎖は、上記に従つて「哺乳動物」、「キメラ」又は「改変」とすることができる。発明の詳細な説明から明らかとなるように、開示技術を使用して特定の定義したもの以外に、例えば、キメラL鎖及び哺乳動物H鎖を含有するハイブリッド抗体、哺乳動物L鎖と共にH鎖のキメラFab蛋白質を含有するハイブリッドFab蛋白質、等のような4ペプチド鎖の集合体のその他の組合せを製造することができる。

30 【0031】「発現ベクター」という用語は、そこに含有されるDNA配列を発現し得るベクターを包含し、即ちコード配列は発現を行ない得るその他の配列に有効に発現するように結合される。これは必ずしも明確に規定されないが、これらの発現ベクターは宿主生物に於いてエピソームとして、又は染色体DNAの一体的部分として複製し得るものでなければならないことを意味する。明らかに、複製可能性が欠如することは、有効に機能し得なくなる。有効な発現ベクターの有用であるが必ずしも必要でない要素は、マーカーコード配列であり、即ち容易に細胞を固定し得る蛋白質を含有する細胞の表現型特性(たとえばテトラサイクリン耐性)をもたらしうな蛋白質をコードする配列である。要するに、「発現ベクター」には機能的定義が与えられ、特定の含有DNAコードを発現し得る全てのDNA配列がこの用語に包含され、同様に特定の配列に適用される。現在この種のベクターはしばしばプラスミドの形態であるので、「プラスミド」と「発現ベクター」とはしばしば互換的に使用される。然しながら、本発明は均等な機能を有し且つ時と共に当業界で公知となり得るような他の形態の発現ベクターをも包含することを意図する。

50 【0032】「組換え宿主細胞」という用語は、組換えDNA技術を用いて作成されたベクターにより形質転換された細胞を意味する。本明細書に定義したように、組換え宿主細胞により産生される抗体又はその改変物(modification)は、この形態転換のため未形質転換宿主で産生されるような少量でなく、より一般的には検出量以下のもので

ない。

【0033】組換宿主から抗体を単離する方法の説明に於いて、「細胞」及び「細胞培養物」という用語は、特記しない限り抗体の起源を示すために互換的に使用される。換言すれば、「細胞」からの抗体の回収は、遠心分離された全細胞からの回収又は培地と懸濁細胞との両者を含有する細胞培養物からの回収のいずれをも意味する。

【0034】B. 宿主細胞培養物及びベクター
本明細書中に開示したベクター及び方法は、広範囲の原核生物及び真核生物に亘る宿主細胞に使用するのに適している。

【0035】一般的には勿論、本発明に有用なベクターを作成する際、DNA配列をクローン化(クローニング)するには原核生物が好適である。例えばE. coli K12菌株294(ATCC No. 31446)が特に有用である。使用し得るその他の微生物菌株はE. coli菌株、例えばE. coli B及びE. coli X1776(ATCC No. 31537)を包含する。これらの例は、勿論例示であって限定を意味するものでない。

【0036】発現用にも原核生物を使用することができる。上記の菌株並びにE. coli W3110(F⁻, λ⁻, 原始栄養性(prototrophic)、ATCC No. 27325)、桿菌例えばBacillus subtilus、及び他の腸内細菌例えばSalmonella typhimurium又はSerratia marcescens及び各種のPseudomonas種を使用することができる。

【0037】一般に、レプリコン及び制御配列を含有し宿主細胞に適合性の種由来のプラスミドベクターを、これら宿主と関連して使用する。通常、ベクターは複製部位並びに形質転換細胞に表現型選択を与え得るマーカー配列を有する。例えばE. coliは、典型的にはpBR322即ちE. coli種から得られるプラスミド(Bolivare et al., Gene 2:95(1977))を用いて形質転換される。pBR322はアンピシリン耐性及びテトラサイクリン耐性遺伝子を有し、従って形質転換細胞を同定するための便利な手段を与える。pBR322プラスミド又はその他の微生物プラスミドは、又、微生物がそれ自身の蛋白質を発現するように使用し得るプロモーターを含有し又は含有するよう改変されなければならない。組換DNAの作成に最も一般的に使用されるプロモーターは、β-ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)及び乳糖プロモーター系(Chang et al., Nature. 275:615(1978); Itakura et al., Science, 198:1056(1977); Goeddel et al., Nature, 281:544(1979))並びにトリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddel et al., Nucleic Acids Res., 8:4057(1980); EPO出願公開第0036776号)を包含する。これらが特に一般的に使用されるが、他の微生物プロモーターも見出され且つ利用されており、これらヌクレオチド配列に関する詳細が公開されており、当業

者はこれらをプラスミドベクターと機能的に結合させることができる(Siebenlist et al., Cell, 20:269(1980))。

【0038】原核生物の他に、酵母培養物のような真核微生物も使用することができる。Saccharomyces cerevisiae即ち一般的なパン酵母が真核微生物として最も一般的に使用されるが、他の多くの菌株も一般的に使用し得る。Saccharomycesに於ける発現については例えばプラスミドYRp7(Stinchcomb et al., Nature, 282:39(1979); Kingsman et al., Gene, 7:141(1979); Tschemper et al., Gene, 10:157(1980))が一般的に使用される。このプラスミドは既にトリプトファン中で増殖する能力を欠如した酵母の突然変異菌株、例えばATCC No. 44076即ちPEP4-i(Jones, Genetics, 85:12(1977))に対し選択マーカーを与えるtrp1遺伝子を含有する。酵母宿主細胞ゲノムの特性としてtrp1欠陥(lesion)が存在するため、トリプトファンの不在下での増殖による形質転換の検出用に有効な環境が得られる。

【0039】酵母ベクターに於ける適当なプロモーター配列は3-ホスホグリセレートキナーゼ(Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073(1980))又はその他の糖分解酵素(Hess et al., J. Adv. Enzymol. Reg., 7:149(1968); Holland et al., Biochemistry, 17:4900(1978))例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼに対するプロモーターを包含する。適する発現プラスミドを作成する際、これら遺伝子に関連する停止配列も、mRNAのポリアダニル化及び停止を行なうように発現させたり配列の発現ベクター3'中へ結合させる。増殖条件により制御される転写の付加的利点を更に有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチクロームC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素並びに上記のグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ及びマルトースとガラクトースとの利用に関する酵素(Holland, 上記)に対するプロモーター領域である。酵母適合性のプロモーターと複製のオリジンと停止配列とを有するプラスミドベクターが適している。

【0040】微生物の他に、多細胞生物由来細胞の培養物も宿主として使用することができる。原則として、任意のこの種の細胞培養物は、脊椎動物由来であっても、或いは無脊椎動物の培養物であっても使用可能である。然しながら、最も興味があるものは脊椎動物細胞であり、脊椎動物細胞の培養(組織培養)による増殖が、近年

日常の手法となった(Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson編(1973))。この種の有用な宿主細胞系の例は、VERO細胞及びHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系並びにW138, BHK, COS-7及びMDCK細胞系である。この種の細胞に対する発現ベクターは一般に、(必要に応じ)複製のオリジン、発現すべき遺伝子の前方に位置するプロモーター並びに任意の必要なりポソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写停止配列を含む。

【0041】哺乳動物細胞に於いて使用するには、発現ベクターに対する制御機能がしばしばウィルス性材料により与えられる。例えば一般的に使用されるプロモーターはポリオーマ、アデノウィルス2及び特にしばしばサルウィルス40(SV40)から得られる。SV40ウィルスの初期及び後期プロモーターが特に有用である。何故なら、これら両者は複製のSV40ウィルスオリジンをも含有する断片としてウィルスから容易に得られるからである。(Fiers et al., Nature, 273:113(1978), これを引用して本明細書に包含する)。より小さい又はより大きいSV40断片も使用し得るが、但しHindIIIから複製のウィルスオリジン内に存在するBglI部位まで延びる約250bp配列が含まれることが必要である。更に一般に所望の遺伝子配列に関連するプロモーター又は制御配列を使用することもでき、且つ使用するのがしばしば望ましい。但し、この種の制御配列は、宿主細胞系に対し適合性であるものとする。

【0042】複製のオリジンは、例えばSV40又はその他のウィルス(例えばポリオーマ、アデノ、VSV、BPV等)源から得られるような外来オリジンを含むようにベクターを作成して供給するか、或いは宿主細胞の染色体複製メカニズムにより供給することができる。ベクターが宿主細胞の染色体中に組み込まれれば、これでしばしば充分である。

【0043】本発明を好適具体例につき本明細書中に説明するが、ここに記載したような宿主細胞、ベクター及び発現系のみに限定されるものでないことが了解されよう。

【0044】C. 使用方法

C. 1. 形質転換:

強固な細胞壁バリアーを持たない細胞を宿主細胞として使用する場合、トランスフェクションはGraham及びVan der EbによりVirology, 52:546(1978)に記載された磷酸カルシウム沈澱法により行なわれる。然しながら、例えば核注入又はプロトプラスト融合によるような細胞中へのDNAの他の導入法も使用することができる。

【0045】原核細胞又は実質の細胞壁構造を含有する細胞を使用する場合、好適なトランスフェクション方法はF. N. Cohen et al., によりProc. Natl. Aca

d. Sci., USA, 69:2110(1972)に記載されたように塩化カルシウムを使用するカルシウム処理である。

【0046】C. 2. ベクターの作成

所望のコード配列と制御配列とを含有する適するベクターの作成は、標準的結合技術を使用する。単離されたプラスミド又はDNA断片を開裂し、適当に処理し且つ所望の形態に再結合して、所要のプラスミドを生成する。使用する方法は、DNA源又は使用する宿主に依存しない。

【0047】開裂は、適当な緩衝液中で1種又はそれ以上の制限酵素により処理して行なわれる。一般に、約1μgのプラスミド又はDNA断片を約20μlの緩衝溶液中で約1ユニットの酵素と共に使用する(特定制限酵素に対する適当な緩衝液及び基質の量は製造業者により特定されている)。37℃にて約1時間インキュベーションする。培養後、フェノール及びクロロホルムでの抽出により蛋白質を除去し、且つ核酸をエタノールでの沈澱により水性フラクションから回収する。

【0048】平滑末端が必要ならば、この調製物を10ユニットのE. coli DNAポリメラーゼI(Klenow)と共に15℃にて15分間処理し、フェノールクロロホルム抽出し、エタノール沈澱する。

【0049】開裂した断片のサイズ分画はD. Goeddel et al. によりNucleic Acids Res., 8:4057(1980)(引用して本明細書に包含する)に記載された6%ポリアクリルアミドゲルを用いて行なわれる。

【0050】結合には、正確な整合性を与えるために適当に末端処理した所望の成分のほぼ等モル量を0.5μgのDNA当り約10ユニットのT4DNAリガーゼで処理する。(開裂したベクターを成分として使用する場合、細菌のアルカリ性ホスファターゼで予備処理することにより開裂ベクターの再結合を防止するのが有用である。)

【0051】下記の実施例に於いて、プラスミド作成に対する正確な結合は、E. coli K12菌株294(ATCC No. 31446)を結合混合物で形質転換することにより確認される。成功した形質転換体は、プラスミドの作成様式に応じてアンピシリン耐性又はテトラサイクリン耐性により選択した。次いで、形質転換体からのプラスミドを調製し、制限分析及び/又はMessing等の方法(Nucleic Acids Res., 9:309(1981))又はMaxam et al. の方法(Methods in Enzymology, 65:499(1980))によって配列決定した。

【0052】D. 方法の概略

D. 1. 哺乳動物抗体

本発明の一部を構成し且つその方法により製造される第1のタイプの抗体は、「哺乳動物抗体」であり、H鎖とL鎖とが成熟哺乳動物Bリンパ球によりin situで、或いはハイブリドーマ培養物の部分として永久株化細胞と融

合した場合に産生される抗体のアミノ酸配列に類似するものである。要するに、これらの抗体は次のようにして産生される。

【0053】H鎖もしくはL鎖をコードするメッセンジャーRNAを適当な起源、即ち成熟B細胞又はハイブリドーマ培養物から単離する。その際RNA単離の標準技術及びポリ-A mRNAを分離するためのオリゴ-dTセルロースクロマトグラフィーを使用する。更にポリ-A mRNAを分画して、場合により所望抗体のL鎖もしくはH鎖に於けるアミノ酸配列をコードするのに十分なサイズの配列を得る。

【0054】次いで、所望のcDNAに特徴的である適当なプライマー好ましくは核酸配列を用いて、mRNAの混合物からcDNAライブラリーを作成する。配列が公知であれば、この種のプライマーを抗体のアミノ酸配列に基いて推定し且つ合成することができる。或いは、所望の抗体を産生する細胞系からの未分画ポリ-A mRNAのcDNA又はポリ-dTを使用することもできる。得られたcDNAを必要に応じポリアクリルアミドゲルでサイズ分画し、次いで適当な制限酵素(例えばPst I)により開裂し且つdG残部で延長したpBR322又はその他の適当なクローニングベクターとアニールするために例えばdC残基で延長する。勿論、他のテイル及び他のクローニングベクター残部を用いてcDNA含有クローニングベクターを形成するその他の手段も使用し得るが、前記のものが標準的且つ好適な選択である。適する宿主細胞菌株、典型的にはE. coliをアニールしたクローニングベクターで形質転換し、得られた形質転換体を例えばテトラサイクリン耐性により、或いはクローニングベクタープラスミド上に存在する他の表現型特性により同定する。

【0055】成功した形質転換体を釣り上げて、マイクロタイター皿又はその他の支持体に移し、更に増殖及び保存する。次いで、これら増殖する培養物のニトロセルロースフィルターのプリント物(imprint)をcDNA中の所望配列に相補的であることが知られた塩基を含有する適当なヌクレオチド配列でプローブする。数種のプローブを使用することができ、好ましくはATP³²でキナーゼ処理することにより標識した合成単鎖DNA配列を使用する。ニトロセルロースフィルターに固定された細胞を溶菌し、DNAを変性し、固定した後にキナーゼ処理したプローブと反応させる。うまくハイブリダイズするクローンをフォトプレートへ接触させて検出し、プラスミドを増殖するコロニーから単離し、遺伝子の所望部分が存在することを証明するために当業界で知られた手段により配列決定する。

【0056】所望の遺伝子断片を切断処理して、適当な発現ベクター中へ挿入した場合の制御セグメントとの適当な解読枠を確保する。典型的には、ヌクレオチドを5'末端へ付加して開始信号と適当に位置する制限エン

ドヌクレアーゼ部位とを含むようにする。

【0057】次いで、適当に処理した遺伝子配列を、遺伝子と共に解読枠にあるプロモーターを含有し且つ使用する宿主に対し適合性であるベクター中に配置する。例えば米国特許出願第307473号、第291892号及び第305657号(EPO特許公開第0036776号、第0048970号及び第0051873号)明細書に記載されたような多数のプラスミドは、適当なプロモーターと制御配列とリボソーム結合部位と転写停止部位と便利なマーカーとを既に含有する。

【0058】本発明に於いては、L鎖をコードする遺伝子及びH鎖をコードする遺伝子を上記の手法により別々に回収する。即ち、これらは、それぞれ適当なプロモーター及び翻訳制御の下にある限り、別々の発現プラスミド中へ挿入することができ、或いは一緒に同じプラスミドに挿入することができる。

【0059】次いで、上記のように作成した発現ベクターを使用して適当な細胞を形質転換する。L鎖及びH鎖を同一種又は異なる種の別々の細胞培養物中に形質転換することができ、L鎖及びH鎖に対する別々のプラスミドを使用して単一の細胞培養物を同時形質転換することができ、或いは両遺伝子を含有し且つL鎖とH鎖との両者に対する遺伝子を発現し得る単一の発現プラスミドを単一の細胞培養物に形質転換することができる。

【0060】上記3つの選択のどれを選択するかに関係なく、細胞を所望蛋白質の産生に適する条件下で増殖させる。この種の条件は、主として所望蛋白質の性質ではなく、発現ベクター中に使用されるプロモーター及び制御系のタイプにより支配される。次いで、このように産生された蛋白質を当業界で公知の方法により細胞培養物から回収するが、方法の選択は必然的に蛋白質の発現された形態に依存する。例えばE. coliで発現された成熟異種蛋白質を不溶性粒子として細胞内に沈着させるのが一般的であり、これは回収を可能にするための細胞の溶菌と変性剤(denaturant)中への可溶化とを必要とする。他方、酵母及び細菌の菌株中の適切な合成条件下の蛋白質は培地中(酵母及びグラム陽性菌)又はペリプラズム空間(グラム陰性菌)へ分泌することができ、それほど激しくない方法により回収することができる。一般に、宿主としての組織培養細胞は異種蛋白質の便利な回収を可能にすると思われる。

【0061】H鎖とL鎖とを同一宿主中で同時発現させる場合、単離法は再編成抗体を回収するように設計される。これは下記するようにin vitroで行なうことができ、或いは細胞質の還元環境からIgG鎖を分泌する微生物中in vivoで行なうことも可能である。より詳細な説明は下記D. 2. に示す。

【0062】D. 2. 鎖組換え技術

H鎖及びL鎖又はその部分を互いに分離して産生する本発明の方法の能力は、独特且つ先例のない免疫グロブリン

ン、Fab領域及び単一価の抗体の集合体を得る機会を与える。このような製造は、単離した鎖を再組立てする技術の使用を必要とする。この種の手段は当業界で公知であり、従ってこれらにつきここで再検討するのが適当である。

【0063】単一鎖のジスルフィド結合を含有する蛋白質を還元し且つ再酸化して天然構造及び活性を高収率で再生させているが(R. B. Freedman et al., *Enzymology of Post Translational Modification of Proteins*, 1:157-212 (1980) Academic Press 社、NY.), ジスルフィド結合により結合されている不連続ポリペプチド鎖より成る蛋白質は還元開裂の後に *in vitro* で再編成するのが困難である。精巧な場合であるインシュリンは永年に亘り多くの実験的注目を集めており、現在ではこれに関し工業的方法が確立されているほど効率的に再編成することができる(R. E. Chance et al., *Peptides*: 第7回米国ペプチドシンポジウムの Proceedings (D. H. Rich及びE. Gross編) 721-728. Pierce Chemical Co., Rockford, I L. (1981))。

【0064】免疫グロブリンは、インシュリンよりも困難な問題を含むことが判明している。四元体は15個もしくはそれ以上のジスルフィド結合により分子内及び分子間で安定化されている。鎖間ジスルフィドのみの開裂により分解されたH鎖とL鎖とを再結合して、鎖間ジスルフィドを復帰させなくても抗体活性を再取することが可能であった(G. M. Edelman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 50:753 (1963))。更に、蛋白質分解により生成される活性なIgGの断片(約50,000MWのFab断片)をそれらの完全に還元したH鎖成分とL鎖成分とに開裂させ、これらをかなり効率的に再編成して活性抗体を与えることができる(E. Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 52:1099 (1964); P. L. Whitney et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 53:524 (1965))。完全還元された天然IgGから活性抗体を再編成する試みは、恐らく還元鎖及び副産物又は中間物が再編成過程に於いて不溶解性であるため、完全に不成功であった(M. H. Freedman et al., *J. Biol. Chem.*, 241:5225 (1966))。然しながら、免疫グロブリンを完全還元の前にリジンのポリアデニル化によりランダムに改変すれば、分離される鎖は再酸化の際に抗原結合性の活性を回収する能力を有する(上記)。

【0065】免疫グロブリンの再編成に対して特に適した方法は、現在では古典的となったインシュリン組換技術から得られるものであり、ここでは出発物質を酸化スルフィトリシス(Oxidative sulfitolysis)により調製し、蛋白質に於ける全てのシステインのチオール不安定性S-スルホン酸基を発生させ、ジスルフィドを非還元的に破壊する(Chance et al., 上記)。酸化スルフィ

トリシスは緩和なジスルフィド開裂反応であり(G. E. Means et al., *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, San Francisco (1971))、これはしばしば還元より緩和であり、且つジスルフィド再生がチオール-ジスルフィド相互交換を介して生じ得る緩和な還元剤に露呈されるまで安定であるような誘導体を生成する。本発明に於いて、酸化スルフィトリシスにより生成されるH鎖及びL鎖のS-スルホネートは、ジスルフィド結合生成を行なうために空気酸化とチオール-ジスルフィド相互交換との両者を用いて再編成された。一般的手順は、1982年12月22日付で出願された米国特許出願第452187号(EPO出願第83.307840.5号)明細書に詳細に示されており、これを参考のためここに引用して本明細書に包含する。

【0066】D. 3. 組換技術により可能な変種

上記D. 1及びD. 2に記載した技術を用いて、哺乳動物抗体の効率的産生を得るために用いた他の操作を全く簡潔に変化させて、この基本的抗体型の多くの変種を産生させることができる。これらの変種は組換技術の使用に本質的であり、通常見られる哺乳動物免疫グロブリン鎖に於けるアミノ酸配列の遺伝子レベルでの改変を可能にし、この方法の真価はこれら変種を得る能力を有すること並びに所望の珍しく、しばしば汚染された分子を経済的且つ特異的に産生する能力を有することにある。更に、これらの変種は個々の鎖を単離する能力を特徴とし、従って新規な集合体をもたらす。

【0067】要するに、遺伝子操作は発現ベクターの作成過程でゲノム材料の再編成を可能にするので、この種の再編成を行なって「天然」抗体、もしくは免疫グロブリンの成分に対し新規なコード配列を産生することができる。下記に詳細に説明するように、哺乳動物H鎖に対するコード配列は、単一起源又は単一クラスからは完全には得ることができず、配列の部分を例えばネズミ-ネズミハイブリドーマ、ヒト-ネズミハイブリドーマ或いは一連の抗原処理に呼応して分化させたB細胞のような種々異なるmRNAプールからD. 1に記載した技術により回収することができる。各々の場合に於ける配列の所望の部分は、D. 1に記載したプローブ及び分析技術を用いて回収され且つ同じモデル配列の部分について使用されると同じ結合法を用いて発現ベクターに組換えることができる。この種のキメラ鎖は任意所望の長さで作成することができ、例えば完全なH鎖を作成することができ、そのFab領域に対する配列のみを作成することもできる。

【0068】組換技術の使用により生ずる付加的な融通性は、別々の培養物に於いてH鎖とL鎖もしくはその断片或いは同じ培養物に於けるH鎖とL鎖との独特な組合せを産生し、且つ適当な成分が組立てられるまで抗体又は免疫グロブリン集合体の再編成を防止する能力から生

ずる。例えば、通常の抗体産生はL鎖及びH鎖の部分が同じ細胞に於ける特定の決定子に呼応して作成されるので、自動的に「哺乳動物の交代」の生成をもたらすが、本発明の方法は完全に新規な混合物を組立てる機会を提供する。若干制限された量の「ハイブリッド」抗体が「クワドローマ(quadroma)」、即ちこのように産生されたH鎖とL鎖とのランダム集合を可能にする2種のハイブリッドマ細胞培養物の融合体により産生されている。

【0069】本発明は、所望鎖をin vitroで混合することにより、或いは同じ培養物を所望鎖に対するコード配列で形質転換させることにより一層制御された所望鎖の組立てを可能にする。

【0070】D. 4. 複合免疫グロブリン

哺乳動物抗体の組換え体産生につき詳細に説明した上記の方法を若干改変して使用することにより、本発明に包含される他の種類の抗体又はNS Iを作成することができる。鎖の相同性が種々異なる特異性の免疫グロブリン配列に対応するような特定具体例の非特異性複合免疫グロブリンを作成するには勿論、H鎖とL鎖とを別々の培養物で作成し、これらを所望に応じて再組立てすることのみを必要とする。

【0071】例えば、抗-CEAL鎖/抗-肝炎H鎖の複合抗体を作成するには、L鎖クローンのための鋳型として使用するmRNAの適する原料は、例えばE. 1に記載する抗-CEA産生細胞系である。H鎖に対応するmRNAは肝炎感染に反応して生じたB細胞から、或いはB細胞がこの種の起源であるようなハイブリッドマから得られるであろう。この種の複合体は本発明の方法を用いて殆んど任意に組立てることができ、且つ各鎖に対する鋳型として使用するのに適したmRNAの入手し得る起源によってのみ制約されることが明らかである。この方法の他の特徴は、全て上記のものと同様である。

【0072】D. 5. ハイブリッド抗体

ハイブリッド抗体は、2種以上の抗原と同時に反応し得るので特に有用である。例えば上記D. 4に示したような種々異なる抗原に対する抗体の鎖に対応するH鎖とL鎖との対は、4つの別々の培養物で作成され、四元体の時期尚早な組立てを防止する。この後、別々に作成された4種のペプチドを混合することにより、所望の四元体まで組立てることができる。ランダムな集合は極めて望ましくない産生物の生成をもたらし得るが、同質(相同)のL鎖及びH鎖が互いに結合されて他の対とは一致しないような産生物のその部分は所望のハイブリッド抗体を与える。

【0073】D. 6. キメラ抗体

キメラ抗体(例えば可変配列が不変配列とは別に誘導される)を作成するには、上記D. 1及びD. 2の手順を適当に改変及び付加して応用することができる。好適手順は、H鎖及びL鎖の部分をコードする遺伝子の所望部分を適当な種々異なる起源から回収し、これら断片を制

限エンドヌクレアーゼにより再結合して各鎖をコードする遺伝子を再編成することである。

【0074】例えば、特に好適なキメラ構造に於いて、ネズミハイブリッドマ培養物により産生される抗体の可変配列をコードするH鎖遺伝子及びL鎖遺伝子の部分をこの培養物から回収し且つクローニングし、そしてヒト抗体に対するH鎖及びL鎖の不変領域をコードする遺伝子断片を例えばヒト骨髓腫細胞から回収しクローニングする。次いで適する制限酵素を使用して、ネズミ遺伝子の可変部分をヒト遺伝子の不変領域へ2つの鎖のそれぞれにつき結合させることができる。キメラ鎖はD. 1に示したように産生し、D. 2に示したように合体させ、非キメラ型と同様に使用する。勿論、鎖に於ける任意の接合点を選択することができる。

【0075】D. 7. 改変抗体

改変抗体は、本質的にキメラ抗体の範囲内にある。ここでも、D. 1及びD. 2の技術を応用することができる。然しながら鎖の接合部分ではなく適するアミノ酸の改変、欠失又は付加を例えば突然変異のような可能な技術により作成する(上記)。例えば、減少した補体固定(結合)性を有する抗体をコードする遺伝子、或いは向上した金属結合能力を有する遺伝子をこの種の技術を用いて作成する。例えば、後者のクラスはメタロチオネインI Iをコードする公知の遺伝子配列を利用することができる(M. Karin et al., Nature, 299:797(1982))。この分子断片のキレート化特性は、重金属を腫瘍部位まで運ぶ際、腫瘍造影に於ける助剤として有用である(D. A. Scheinberg et al., Science, 215:19(1982))。

【0076】D. 8. 単一価の抗体

他の好適具体例に於いて、第3の(H)鎖のFc領域と結合した一对のH鎖及びL鎖から成る抗体を生成させる。これらの抗体は特に有用な性質を有する。これらは、通常の抗体と同様に、例えば腫瘍のような組織の抗原表面を標的として使用することができるが、通常の抗体とは異なり、これらは標的組織の抗原表面を後退させて非受容性とはならない。通常の抗体の使用は、数時間でこの種の表面抗原の集合及びその後の失活をもたらす。

【0077】単一価の抗体の作成方法は、本発明の簡潔な応用である。所望のFc領域のH鎖に対する遺伝子を制限酵素により開裂させ、所望のFc領域をコードするその部分のみを発現する。次いで、この部分をD. 2の技術を用いて別々に作成したH鎖に結合し、所望対をH/H及びFc/Fc組合せ物から分離し、別々に産生したL鎖を付加する。このようにして、2つのH鎖部分の予備結合は、通常の抗体が生成される可能性を減少させる。

【0078】D. 9. Fab蛋白質

同様に、H鎖部分に対する完全遺伝子を含む必要はない。上記の変種を全てFab蛋白質の産生に対する方法

に積み重ねることができ、全体的手順はアミノ末端 220 個のアミノ酸をコードする H 鎖の部分の適当な発現ベクターで使用する点のみ相違する。

【0079】E. 好適具体例の特定例

上記に本発明を一般的意味に於いて記載したが、所望抗体を産生させる実験手順の詳細を説明するために以下いくつかの特定具体例を示す。

【0080】例 E. 1 は抗 CEA 抗体成分を作成するための即ち「哺乳動物抗体」を作成するための一般的手順を示している。

【0081】例 E. 3 は再編成方法を示しており、従って哺乳動物性複合ハイブリッド及びキメラ免疫グロブリン並びに Fab 蛋白質及び単一価の抗体を製造するために応用できる。

【0082】例 E. 4 は、可変領域と不変領域とが種々異なる起源から得られるように H 鎖もしくは L 鎖を処理するための手順を示している。

【0083】例 E. 5 は短くした H 鎖ゲノムを得る方法を示しており、これは Fab 領域の産生を可能にし且つ同様に Fc 領域の産生も可能にする。

【0084】以下、実施例により本発明を説明するが、これらのみに限定されない。

【0085】E. 1. ネズミ抗-CEA 抗体鎖に対する発現ベクターの作成及びペプチド合成

胎生期癌の抗原 (CEA) は、ヒトオリジンの或る種の腫瘍細胞の表面に関連する (P. Gold et al., J. Exp. Med., 122:467 (1965)). CEA に結合する抗体 (抗-CEA 抗体) は、これら腫瘍の早期発見に有用であり (T. R. Van Nagell et al., Cancer Res., 40:502 (1980)), 表面に CEA を支持すると思われるヒト腫瘍の処置に使用できる能力を有する。Ig γ 型 (クラス) の抗-CEA 抗体を分泌するネズミハイブリドーマ細胞系 (CEA. 66-E3) が C. Wager et al., J. Immunol., 130:2308 (1983) (この文献を引用して本明細書に包含する) に記載されているように調製されて、mRNA 源として使用された。この細胞系による抗 CEA 抗体の産生を決定した。これら細胞により産生された抗体の N-末端配列を次のようにしてモノクローナル抗-CEA のそれと比較した。精製した IgG を PCA 酵素で処理し (D. N. Podell et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 81:176 (1978)), 次いで 6M グアニジン塩酸塩と 10mM 2-メルカプトエタノールに於いて解離させた (1.0mg の免疫グロブリン、5 分間、100°C の水浴)。解離した鎖をアルキルフェニルカラム (Waters Associates 社製) に於いて 100% A (0.1%, TFA-水) ~ 90% B (TFA/H₂O/MeCN: 0.1/9.9/90) の直線勾配を用いて 0.8ml/min. の流速で分離した。3 つの主たるピークを溶出させ、銀染色によって SDS ゲルで分析した。最初の 2 つのピークは

純粋な L 鎖 (MW 25,000 ダルトン) であり、第 3 のピークは H 鎖と L 鎖との 7:3 混合物であった。1.2nM (ナノモル) の L 鎖を J. E. Shively, Methods in Enzymology, 79:31 (1981) の方法により 0.4nM の NH₂ 末端収率にて配列決定した。H 鎖と L 鎖との混合物 (3nM) も配列決定し、L 鎖の配列を二重配列から推定して H 鎖の配列を得た。

【0086】以下の説明に於いて、CEA. 66-E3 により産生された抗 CEA 抗体に対する H 鎖及び L 鎖の遺伝子の単離及び発現につき記載する。これら鎖の不変領域はそれぞれ γ 及び κ 型 (family) に属するので、「L 鎖」と「 κ 鎖」及び「H 鎖」と「 γ 鎖」とをそれぞれ以下では互換的に使用する。

【0087】E. 1. 1. 抗 CEA の L 鎖及び H 鎖 (κ 及び γ 鎖) に対するメッセンジャー RNA の単離

CEA. 66-E3 細胞から全 RNA を Lynch et al., Virology, 98:251 (1979) により報告されたように抽出した。これら細胞を遠心分離によりペレット化し、約 1g 部分のペレットを 10mM NaCl, 10mM トリス HCl (pH 7.4), 1.5mM MgCl₂ の 10ml 中に再懸濁した。この再懸濁した細胞を最終濃度 1% まで非イオン性表面活性剤 NP-40 を添加して溶菌し、核を遠心分離により除去した。1% 最終濃度まで SDS (pH 7.4) を添加した後、上清を 3ml ずつのフェノール (再蒸溜) / クロロホルム: イソアミルアルコール 25:1 にて 4°C で 2 回抽出した。水相を NaCl 中で 0.2M とし、2 倍容量の 100% エタノールを添加し、-20°C で 1 晩貯蔵することにより全 RNA を沈澱した。遠心分離後、ポリ-A mRNA を Aviv 及び Leder, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69:1408 (1972) により記載されたオリゴ-dT セルロースクロマトグラフィーにより全 RNA から精製した。1g の細胞から 142 μ g のポリ-A mRNA が得られた。

【0088】E. 1. 2. H 鎖及び L 鎖の DNA 配列挿入物を有するプラスミドを含有した E. coli コロニーライブラリーの作成

上記 E. 1. 1 で調製した未分画ポリ-A mRNA の 5 μ g を Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979) 及び Wickens et al., J. Biol. Chem., 253:2483 (1978) (この文献を引用して本明細書に包含する) により、二重鎖 (ds) cDNA のオリゴ-dT プライム処理調製物に対する鋳型として使用した。この cDNA を 6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって寸法 (サイズ) 分画し、長さ 600 塩基対より大きい ds cDNA の 124ng を電気溶出によって回収した。20ng の ds cDNA を Chang et al., Nature, 275:617 (1978) (この文献を引用して本明細書に包含する) に記載された末端 (ターミナル) デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いてデオキシ C 残基で延長させ、予め Pst I により開裂させ、デオキシ G で処理した

200ngのプラスミドpBR322(Bolivar et al., Gene, 2:95(1977))と共にアニールした。それぞれアニールした混合物を*E. coli* K12菌株294(ATCC No. 31446)に形質転換した。約8,500種のアンピシリン感受性かつテトラサイクリン耐性の形質転換体が得られた。

【0089】E. 1. 3. 合成プローブの作成

可変領域DNA配列の25塩基対3'で始まるネズミOPC21κ鎖に対する不変領域のコード配列に補完(相補)的な14元体、即ち5'GGTGGGAAGATGGA3'をκ鎖プローブとして使用した。ネズミMOPC21γ鎖に対する可変領域DNA配列の72塩基対3'に位置するコード配列に補完的な15元体、即ち5'GACCAGGCATCCCAG3'をγ鎖遺伝子プローブとして使用した。

【0090】両プローブは、ドイツ公開公報第2644432号(この文献を引用して本明細書に包含する)に記載されたホストリエステル法により合成し、次のようにキナーゼ処理して放射能活性にした。250ngのデオキシオリゴヌクレオチドを60mMトリスHCl(pH 8)、10mM MgCl₂、15mM β-メルカプトエタノール及び100μCi(γ-P³²)ATP(Amersham, 5,000Ci/mM)の25μl中に入れた。5ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼを加え、反応を37℃にて30分間進行させ、EDTAを20mMまで加えることにより停止させた。

【0091】E. 1. 4. κ鎖又はγ鎖配列に対するコロニーライブラリーの選別

上記E. 1. 2に記載したように、調製した約2,000個のコロニーをLB(Miller, Experiments in Molecular Genetics, p. 431-3, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York(1972))+5μg/mlのテトラサイクリンを含有するマイクロタイター皿の穴に個々に接種し、DMSOを7%まで添加した後、-20℃で貯蔵した。このライブラリーからの個々のコロニーを2組のSchleicher及びSchuell BA85/20のニトロセルロースフィルターに移し、LB+5μg/mlテトラサイクリンを含有する寒天板で増殖した。37℃にて約10時間増殖した後、これらのコロニーフィルターをLB+5μg/mlテトラサイクリンと12.5μg/mlのクロラムフェニコールとを含有する寒天板に移し、37℃にて1晩再培養した。次いで、各コロニーからのDNAを変性させ、Grunstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72:3961(1975)(この文献を引用して本明細書に包含する)に記載されたGrunstein-Hogness法の変法によってフィルターに固定した。各フィルターを0.5N NaOHと1.5M NaClとの上に3分間浮遊させてコロニーを溶菌し、DNAを変性させ、次いで3M NaClと0.5MトリスHCl(pH 7.5)の上に15分

間浮遊させて中和した。次いでこれらフィルターを2×SSC上に更に15分間浮遊させ、80℃の減圧オーブン内で2時間焼成した。これらフィルターを0.9M NaCl、1×Denhardt's, 100mMトリスHCl(pH 7.5)、5mM Na-EDTA、1mM ATP、1M 燐酸ナトリウム(二塩基性)、1mMピロ燐酸ナトリウム、0.5%NP-40及び200μg/ml*E. coli* tRNAに於いて室温で2時間予備ハイブリゼーションした後、同じ溶液で1晩ハイブリゼーションし(実質的にWellace et al., Nucleic Acids Research, 9:879(1981)に記載されている)、この場合、上記のキナーゼ処理したκプローブ又はγプローブの約40×10⁶cpmを使用した。6×SSC、0.1%SDS中に於いて、37℃で激しく洗浄した後、これらフィルターをDupont Lightning-Plus強化スクリーンを用いてKodak XR-5 X線フィルムに-80℃で16~24時間露出した。κ鎖プローブとハイブリダイズした約20種のコロニー及びγ鎖プローブとハイブリダイズした20種のコロニーを特性化した。

【0092】E. 1. 5. κDNA配列プローブにハイブリダイズしたコロニーの特性化

κ鎖プローブにハイブリダイズした数種の異なる形質転換体から単離したプラスミドDNAをPst Iにより開裂し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分画した。この分析により、多数のプラスミドDNAが十分な長さのκ鎖をコード化するのに十分な大きさのcDNA挿入物を含有することが示された。これらプラスミドの1種に於けるcDNA挿入物の完全ヌクレオチド配列をSmith, Methods Enzymol., 65:560(1980)(この文献を引用して本明細書に包含する)に記載されたジデオキシヌクレオチド鎖停止法により、制限エンドヌクレアーゼ開裂断片をM13ベクター中へサブクローニングした後に決定した(Messing et al., Nucleic Acids Research, 9:309(1981))。図2、図3、図4および図5はpK17G4のcDNA挿入物のヌクレオチド配列を示し、図6、図7および図8は対応するアミノ酸配列を有する遺伝子配列を示している。ネズミ抗-CEAκ鎖の全コード領域を、この1種の大型DNA断片につき単離した。κ鎖のアミノ酸配列は、pK17G4 cDNA挿入物のヌクレオチド配列から推定して、成熟ネズミ抗-CEAκ鎖の最初の23個のN-末端アミノ酸と完全に一致し、これは精製したネズミ抗-CEAκ鎖のアミノ酸配列分析により決定された。pK17G4のコード領域は、予備配列の27塩基対もしくは9個のアミノ酸と成熟蛋白質の642塩基対もしくは214個のアミノ酸を含有する。グリコシル化していない成熟蛋白質(MW24,553)は、12個のアミノ酸のJ1結合領域を含め119個のアミノ酸から成る可変領域と107個のアミノ酸から成る不変領域とを有する。アミノ酸215の後の停止コドンの後にポリ-A付

加に至るまで3'末翻訳配列の212塩基対が始まる。pK17G4を同定するために使用したκ鎖プローブは、ヌクレオチド374-388にハイブリダイズする(図、図3、図4および図5)。

【0093】E. 1. 6. γ1 DNAプローブにハイブリダイズしたコロニーの特性化

H鎖γ1プローブとのハイブリダイズに対し陽性である数種の形質転換体から単離されたプラスミドDNAを、上記E. 1. 5. に記載したようにPst I制限エンドヌクレアーゼ分析にかけた。最も大きいcDNA挿入物断片を示すプラスミドDNAを後の試験用に選択した。ネズミH鎖(γ-1鎖)をコード化するヌクレオチド配列は、可変領域と不変領域との間の接合部近くにNco I制限エンドヌクレアーゼ開裂部位を有する。選択したプラスミドDNAをPst IとNco Iとの両者により消化し、ポリアクリルアミドで寸法分画した。この分析はNco I制限エンドヌクレアーゼ部位を有する多数のプラスミドDNAの同定を可能にするが、このいずれもネズミ抗-CEAH鎖の全コード化領域をコードするのに充分大きいcDNA挿入物断片を示さない。

【0094】単離した1種のプラスミド(即ちpγ298)に於いて、約1300bpのcDNA挿入物は5'末翻訳領域、信号配列及びH鎖のN-末端部分に対する配列情報を有する。pγ298はネズミ抗-CEAγ1鎖に対するC-末端配列をコードしなかったため、プラスミドDNAを他のコロニーから単離してPst I及びNco Iで選別した。pγ11のcDNA挿入物に於けるC-末端領域を配列決定して、停止コドンと3'末翻訳配列とpγ298から喪失されたコード配列の部分とを含有することが示された。

【0095】図9、図10、図11、図12、図13及び図14はネズミ抗-CEAH鎖の全ヌクレオチド配列を示し(Smith, Methods Enzymol., 65:560(1980)のジデオキシヌクレオチド鎖停止法により決定する)、図15、図16、図17、図18および図19は翻訳配列を含んでいる。

【0096】pγ298 cDNA挿入物のヌクレオチド配列から推定したγ1(H鎖)のアミノ酸配列は、精製ネズミ抗-CEAγ1鎖のアミノ酸配列分析により決定して成熟ネズミ抗-CEAγ1鎖の最初の23個のN-末端アミノ酸に完全に一致する。コード領域は予備配列の57塩基対もしくは19個のアミノ酸と、成熟蛋白質の1346塩基対もしくは447個のアミノ酸とより成っている。グリコシル化されていない成熟蛋白質(MW52,258)は、12個のアミノ酸のD領域を含め135個のアミノ酸より成る可変領域と、13個のアミノ酸より成るJ4結合領域とを有する。不変領域は324個のアミノ酸である。アミノ酸447の後の停止コドンに続いて、ポリ-A付加まで96bpの3'末翻訳配列が開始する。pγ298及びpγ11を同定するために使用したプ

ローブは、ヌクレオチド528-542にハイブリダイズした(図9、図10、図11、図12、図13及び図14)。

【0097】E. 1. 7. ネズミ成熟抗-CEA κ鎖遺伝子を直接発現させるためのプラスミドの作成、pKCEAtrp207-1*

図20、図21および図22はpKCEAtrp207-1*の作成を示している。

【0098】まず、単一のtrpプロモーターを有する中間プラスミドpHGH207-1*を次のように作成した: プラスミドpHGH207(1981年10月1日付出版の米国特許出願第307,473号(EPO公開第0036776号)に記載)は、二重lacプロモーターに続いてEcoR I部位に整列(フランキング)するtrpプロモーターを有し、これを使用してpHCH207-1を作成した。pHGH207をBamH Iで消化し、EcoR Iで部分消化した。完全trpプロモーターを含有する最も大きい断片を単離し、これをpBR322からの最も大きいEcoR I-BamH I断片に結合し、この結合混合物を使用してE. coli 294を形質転換した。Tet^r Amp^rのコロニーを単離し、これらの殆んどはpHGH207-1を含有した。amp^r遺伝子とtrpプロモーターの間にEcoR I部位を欠如するpHGH207-1*をEcoR IでのpHGH207-1の部分消化、末端に於けるKlenow及びdNTPの充填及び再結合によって得た。

【0099】5μgのpHGH207-1*をEcoR Iで消化し、これら末端を60mM NaCl, 7mM MgCl₂, 7mM トリスHCl(pH7.4)及び1mMの各dNTPを含有する50μlの反応液中で12ユニットのDNAポリメラーゼを用いて37℃にて1時間延長し、次いでフェノール/CHCl₃で抽出しエタノールで沈澱させた。沈澱したDNAをBamH Iで消化し、大ベクター断片(断片1)を5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、電気溶出、フェノール/CHCl₃抽出及びエタノール沈澱によって精製した。

【0100】このDNAを10mM トリス(pH8)、1mM EDTAの50μl中に再懸濁し、500ユニットの細菌性アルカリホスファターゼ(BAP)で65℃にて30秒間処理し、フェノールCHCl₃抽出し、エタノール沈澱させた。

【0101】L鎖配列1部を含有するDNA断片を次のように作成した: 7μgのpK17KG4 DNAをPst Iで消化しcDNA挿入物を含有するκ鎖を6%ゲル電気泳動及び電気溶出によって単離した。フェノール/CHCl₃抽出、エタノール沈澱及び水中への再懸濁の後、この断片をAva I Iによって消化した。333bpのPst I-Ava I I DNA断片を単離し、6%ポリアクリルアミドゲルから精製した。

【0102】15ヌクレオチドDNAプライマーをホストトリエステル法(G. O. 2,644,432(上記))に

より合成し、次の配列を有した:

Met Asp Ile Val Met
5' ATG GAC ATT GTT ATG 3'

【0103】5'メチオニンは開始コドンとして作用する。500ngのこのプライマーを0.5mM ATPを含有する20μlの反応液中で10ユニットのT4DNAキナーゼにより5'末端でリン酸化した。約200ngのPst I-Ava I I DNA断片を20μlのリン酸化したプライマーと混合し、95℃まで3分間加熱し、ドライアイスエタノール浴中で急速に凍結させた。変性したDNA溶液を60mM NaCl, 7mM MgCl₂, 7mM トリスHCl(pH 7.4), 12mMの各dNTPと成し、12ユニットのDNAポリメラーゼI-大断片を加えた。37℃にて2時間培養した後、このプライマー修復反応物をフェノール/CHCl₃で抽出し、エタノール沈澱させてSau3Aで完全に消化した。次いで、反応混合物を6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動にかけ、電気泳出の後にSau3Aに対し平滑末端の182塩基対アミノ末端断片(断片2)の約50ngを得た。

【0104】100ngの断片1(上記)と50ngの断片2とを20mM トリスHCl(pH 7.5), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 2.5mM ATP及び1ユニットのT4DNAリガーゼの20μlに於いて合せた。14℃にて1晩結合させた後、この反応物をE. coli K12菌株294で形質転換した。多数のアンピシリン耐性形質転換体からのプラスミドDNAの制限エンドヌクレアーゼ消化は適正な作成を示し、DNA配列分析はこの新規なプラスミドpKCEA Int1の開始コドンを紹介して所望のヌクレオチド配列を証明した(図20、図21および図22)。

【0105】κL鎖遺伝子のコード化配列の残部は次のように作成した: 7μgのK17G7 DNAからのPst I cDNA挿入物断片をAva I Iで部分消化させ、Ava I I付着末端をDNAポリメラーゼI大断片反応に於いて平滑末端部まで延長させた。6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に続き、686塩基対のPst I-平滑末端Ava I I DNA断片を単離し、精製し、Hpa I I制限エンドヌクレアーゼ消化にかけた。497塩基対のHpa I I-平滑末端Ava I I DNA断片(断片3)を単離し、ゲル電気泳動の後に精製した。

【0106】10μgのpKCEA Int1 DNAをAva Iで消化し、DNAポリメラーゼI大断片で延長化し、Xba Iで消化した。大平滑末端Ava I-Xba Iベクター断片と、小平滑末端Ava I-Xba I断片とを単離し、6%ポリアクリルアミドゲルから電気泳動の後に精製した。大ベクター断片(断片4)を細菌性アルカリホスファターゼ(BAP)で処理し、小断片をHpa I Iで消化させ、6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動にかけ、169塩基対のXba I-Hpa I I DNA断片(断片5)を精製した。約75ngの断片4と約50ngの断片3と約50ngの

断片5とをT4DNAリガーゼ反応物中であわせ、14℃にて1晩培養し、反応混合物をE. coli K12菌株294で形質転換した。6種のアンピシリン耐性形質転換体からのプラスミドDNAを制限エンドヌクレアーゼ消化により分析した1種のプラスミドDNAは適正な作成を示し、これをpKCEA Int2と命名した。

【0107】最終的な作成は、pKCEA Int2からのtrpプロモーターを含むK-CEA断片をpBR322(XAP)中へ結合することにより行なった(pBR322(XAP)は1982年12月22日出願の米国特許出願第452,227号明細書に記載されたように、pBR322からAva I-Pva I I断片の削除(欠失)に続く結合によって作成した)。

【0108】K-CEA断片は、pKCEA Int2をAva Iで処理し、DNAポリメラーゼI(Klenow断片)によりdNTPの存在下で平滑末端化させ、Pst Iで消化し、ゲル電気泳動と電気泳出とにより所望断片を単離して作成した。

【0109】pBR322(XAP)からの大型ベクター断片は、EcoRIによる処理、ポリメラーゼによる平滑末端化及びPst Iによる再消化に続いて、電気泳動と電気泳出とによる大型ベクター断片の単離という順序の処理によって作成した。

【0110】上記のように作成したK-CEA断片とをT4DNAリガーゼにより結合させ、結合混合物をE. coliに上記のように形質転換させた。数種のアンピシリン耐性形質転換体からのプラスミドDNAを分析用に選択し、1種のプラスミドDNAが適正な作成を示し、これをpKCEA trp207-1*と命名した。

【0111】E. 1. 8. ネズミ成熟抗体-CEAH鎖(γI鎖)遺伝子を直接発現するためのプラスミドベクターの作成、pγCEA trp207-1*

図23、図24および図25はpγCEA trp207-1*の作成を示している。このプラスミドは、γ1遺伝子のC-末端領域の作成で始まる2つの部分に於いて作成した。

【0112】5μgのプラスミドpHGH207-1*をAva Iで消化し、DNAポリメラーゼI大型断片(Klenow断片)で平滑末端まで延長化し、フェノール/CHCl₃で抽出し、エタノール沈澱させた。DNAをBamHIで消化し、BAPで処理し大型断片(断片A)を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び電気泳出により精製した。

【0113】約5μgのpγ11をPst Iにより消化し、そして遺伝子のC末端部分を有するγ鎖cDNA挿入物切断片を精製し、Ava I Iで消化し、次いでAva I I付着端部をクノールで延長化し、次いでTaq Iの消化を行なった。375塩基対の平滑端Ava I I-Taq I断片(断片B)を単離し、そしてゲル電気泳動および電気泳出により精製した。

29

【0114】9 μ gのpy 298をTaq I及びBamH Iで消化して496塩基対断片(断片C)を単離した。

【0115】ほぼ等モル量の断片A、B及びCを20 μ lの反応混合物中で14℃にて1晩結合させ、E. coli菌株294に形質転換させた。6種のアンピシリン耐性形質転換体からのプラスミドDNAを制限エンドヌクレアーゼ分析にかけ、pyCEA Intと命名した1種のプラスミドDNAは γ 1のC-末端部分の正確な作成を示し*

met glu val
5' ATG GAA GTG

をホスホトリエステル法(上記)により合成した。

【0117】5メチオニンは開始コドンとして作用する。500ngのこの合成オリゴマーであるプライマーを0.5mM ATPを20 μ lの反応混合物中に含有する10ユニットのT4 DNAキナーゼと反応させて5末端でリン酸化した。500ngの280塩基対Alu I-Rsa I

DNA断片をリン酸化したプライマーと混合した。この混合物を95℃で3分間熱変性させ、ドライアイスエタノール中で急冷した。変性したDNA溶液を60mM NaCl, 7mM MgCl₂, 7mM トリスHCl(pH 7.4), 12mMの各dNTPとなし、12ユニットのDNAポリメラーゼI-大型断片を加えた。37℃で2時間培養した後、このプライマー修復反応物をフェノール/CHCl₃で抽出し、エタノール沈澱させ、Hpa I Iで完全消化させた。予想された125塩基対の平滑末端-Hpa I I DNA断片(断片D)50ngをゲルから精製した。

【0118】第2の部分のpy 298 DNAをPst Iで消化し、628塩基対のDNA断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、更にBamH I及びHpa I Iで消化した。得られた380塩基対断片(断片E)をゲル電気泳動により精製した。

【0119】5 μ gのpyCEA Int1をEcoR Iで消化し、付着末端をDNAポリメラーゼI(Klenow)と整列させ、BamH Iで消化し、BAPで処理し、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。大型ベクター断片(断片F)を単離し、精製した。

【0120】3つの断片の結合に於いて、50ngの断片Dと100ngの断片Eと100ngの断片Fとを4℃にて20 μ lの反応混合物中で1晩結合させ、これを使用してE. coli K12菌株294を形質転換させた。12種のアンピシリン耐性形質転換体からのプラスミドDNAを正確な作成につき分析し、開始コドンを包囲するヌクレオチド配列がpyCEA Int2と命名したプラスミドにつき正確であることが証明された。

【0121】H鎖遺伝子の発現に使用した発現プラスミドpyCEAtrp207-1は、pBR322(XAP)(上記)からの大型ベクター断片と、pyCEA Int2から作成した2種の断片とを用いて3つの結合により作成する。

【0122】pBR322(XAP)を上記のようにEco

30

*た(図15、図16、図17、図18および図19)。

【0116】N-末端配列を得るため、30 μ gのpy 298をPst Iで消化し、ネズミ抗-CEA γ 鎖のN-末端領域をコード化する628塩基対のDNA断片を単離し、精製した。この断片を更にAlu I及びRsa Iで消化して280塩基対断片を単離した。15ヌクレオチドDNAプライマー、即ち

met leu
ATG CTG 3'

RIで消化し、DNAポリメラーゼ(Klenow)によりdNTPの存在下で平滑末端化させ、次いでPst Iにより処理し、ゲル電気泳動で大型ベクター断片を単離することにより処理した。H鎖遺伝子のN-末端コード化領域と結合したtrpプロモーターを含有するpyCEA Int2からの1543塩基対断片を単離し、その際pyCEA Int2をPst Iに続き、BamH Iで処理し、所望の断片をPAGEにより単離した。遺伝子のC-末端コード化部分を含有する869塩基対断片をAva IによるpyCEA Int2の部分消化、Klenowによる平滑末端化及びBamH Iによる消化、次いでゲル電気泳動による所望断片の精製によって作成した。

【0123】上記3種の断片を標準条件下でT4 DNAリガーゼを用いて結合させ、結合混合物を使用してE. coli菌株294を形質転換させた。数種のテトラサイクリン耐性形質転換体からのプラスミドDNAを分析し、そのうち1種のプラスミドDNAが適正な作成を示し、これをpyCEAtrp207-1と命名した。

【0124】E. 1. 9. E. coliによる免疫グロブリンの鎖の産生

E. coli菌株(W3110-ATCC No. 27325)を標準技術によりpyCEAtrp207-1又はpKCEAtrp207-1で形質転換させた。

【0125】二重形質転換体を得るため、E. coli菌株W3110細胞を予めamp遺伝子からのPst I-Pvu I断片の開裂及び再結合によって改変させた改変pKCEAtrp207-1及びpKCEAtrp207-1 Δ で形質転換させた。pKCEAtrp207-1 Δ で形質転換させた細胞はアンピシリンに対し感受性であるが、テトラサイクリンに対し耐性である。成功した形質転換体をアンピシリンに対する耐性を付与するがテトラサイクリンに対する耐性を付与しないpyCEA Int2を用いて再び形質転換させた。pKCEAtrp207-1 Δ 及びpyCEA Int2の両者を含有する細胞は、アンピシリンとテトラサイクリンとの両者を含有する培地中での増殖により同定した。

【0126】形質転換細胞に於けるH鎖及び/又はL鎖の産生を確認するため、細胞試料を10 μ g/mlのテトラサイクリンを含有し、トリプトファンを含有しないM9培地に接種し、OD550が0.5の読みとなるまで

インドールアクリル酸(I A A)で誘発させた。誘発細胞を種々の時間に亘り、37℃で増殖させ、次いで遠心分離し、2% SDSと0.1M β -メルカプトエタノールとを含有するTE緩衝液中に懸濁させ、5分間煮沸した。10倍容量のアセトンを加え、細胞を22℃に10分間保ち、次いで12,000rpmにて遠心分離した。沈澱物をP. H. O Farrell, J. Biol. Chem., 250: 4007(1975)によるSDS試料緩衝液に懸濁させた。3分間煮沸し、再び遠心分離し、SDSのPAGE(10%)を用いて分画し、銀染色剤により染色し(D. Goldman et al., Science, 211: 1437(1981))、又はL鎖とH鎖とを同定するため、ウサギ抗-ネズミIgGを用いてウェスタンブロット(Western blot)にかけた(W. N. Burnett et al., Anal. Biochem., 112: 195(1981))。

【0127】p γ CEAtrp207-1で形質転換させた細胞は、SDS PAGEに於いてH鎖の分子量に相当するバンドを示し、これは銀染色により展開された。pKCEAtrp207-1で形質転換させた細胞はL鎖に対する適正な分子量バンドを示し、ウェスタンブロットにより同定された。二重形質転換細胞は、ウェスタンブロットによりウサギ抗-ネズミIgGを用いて展開した場合、H鎖とL鎖との両者の分子量蛋白質に対するバンドを示した。これらを図26、図27及び図28に示す。

【0128】図26は、p γ CEAtrp207-1で形質転換させた細胞から銀染色により展開した結果を示している。レーン1はCEA. 66-E3からのモノクローナル抗-CEAH鎖(標準)である。レーン2b-5bはI A A添加後2時間、4時間、6時間及び24時間の経時試料である。レーン2a-5aは対応する未形質転換比較であり、レーン2c-5cは対応する未誘発形質転換体である。

*

E. coli(W3110/p γ CEAtrp207-1*)
E. coli(W3110/pKCEAtrp207-1*)
E. coli(W3110/pKCEAtrp207-1* Δ ,
 p γ CEA Int2)

(細胞1g当り)

5mg γ 1. 5mg κ 0. 5mg κ , 1. 0mg γ

【0132】E. 1. 10. 組換 κ 鎖及び γ 鎖からの抗体の再編成

再編成用のH鎖及びL鎖調製物を得るため、形質転換細胞を大型バッチで増殖させ、収穫し、凍結させた。種々形質転換させた細胞の増殖条件は次の通りとした:

【0133】E. coli(W3110/p γ CEAtrp207-1*)を5 μ g/mlのテトラサイクリンを含有する500mlのLB培地に接種し、回転振盪器で8時間増殖させた。次いで、培養物を酵母栄養分、塩、グルコース及び2 μ g/mlのテトラサイクリンを含有する10lの発酵培地に移した。増殖の際にグルコースを追加し、OD550=2.0にてインドールアクリル酸(I A A)、即ち、

*【0129】図27は、pKCEAtrp207-1で形質転換させた細胞からウェスタンブロットにより展開した結果を示している。レーン1b-6bはI A A添加直後、1時間、3. 5時間、5時間、8時間及び24時間後の誘発細胞からの抽出物であり、1a-6aは対応する未誘発比較であり、レーン7はp γ CEAtrp207-1比較からの抽出物であり、レーン8、9及び10はCEA. 66-E3細胞からの種々な量の抗CEA- κ 鎖である。

【0130】図28は、I A A添加後24時間の二重形質転換細胞の4種のコロニーからウェスタンブロットにより展開した結果を示している(レーン4-7)。レーン1-3は種々の量のモノクローナル γ 鎖比較であり、レーン8及び9はそれぞれ未形質転換細胞抽出物及びp γ CEAtrp207-1形質転換細胞抽出物である。他の定量分析に於いて、E. 1. 10(下記)に従って増殖させた凍結形質転換E. coli細胞をドデシル硫酸ナトリウム(SDS)/ β -メルカプトエタノール細胞溶菌緩衝液中で100℃にて加熱することにより溶菌させた。1部を種々の量のハイブリドーマ抗-CEAを加えたレーンに隣接するSDSポリアクリルアミドゲルに加えた。このゲルをNew England Nuclear社からのI¹²⁵-標識したヒツジ抗-ネズミIgG抗体を用いてウェスタンブロット(Burnett, 上記)により展開させた。これら結果を図29に示す。この図は、E. coli産生物が標準ハイブリドーマ鎖と共に移動することを示し、E. coliに於ける検出し得る蛋白質分解を示さない。哺乳動物細胞からのH鎖はE. coli材料よりも前者がグリコシル化されているため僅かに重いと予想される。ハイブリドーマレーンを標準として使用し、H鎖及びL鎖の産生につき次の推定を行なった:

【0131】

trpデプレッサーを50 μ g/mlの濃度まで加えた。細胞に追加グルコースを最終OD550=4.0まで供給し、これはI A Aを加えてから約6時間で達成された。

【0134】pKCEAtrp207-1*で形質転換させたE. coli(W3110)細胞とpKCEAtrp207-1* Δ 及びp γ CEA Int2で二重形質転換させたものとを上記と同様に増殖させた。但し、I A A添加後6時間に於ける収穫時のOD550は25-30であった。次いで、これらの細胞を遠心分離により収穫し凍結した。

【0135】E. 2. 再編成抗体の分析方法
 抗-CEA活性を再編成の成功に対する基準としてELISAにより測定した。マイクロタイタープレート(Dy

natech Immulon社製)のウェルにCEAを飽和させ、0.1M炭酸塩緩衝液(pH9.3)中の2~5μgCEA/ml溶液100μlを室温で12時間培養することにより行なった。次いで、これらのウェルを燐酸塩緩衝液(PBS)で4回洗浄し、PBSに於ける0.5%BSA200μlを37℃で2時間培養し、PBSで4回洗浄することによりBSAで飽和させた。50μlの各試料を各ウェルに加えた。PBSに於ける0.5%BSA中10μg、5μg、500ng、100ng、50ng、10ng、5ng及び1ngの抗-CEA/mlの50μl試料と、ブランクとしてのPBSに於ける0.5%BSA50μlのみとから成る標準曲線(図30に示す)を作成した。全ての試料をプレート中で37℃にて90分間培養した。

【0136】次いで、これらのプレートをPBSで4回洗浄し、ヒツジ抗-ネズミIgG-アルカリホスフェート(TAGO, Inc.)をPBSに於ける0.5%BSA中の24ユニット/mlの酵素濃度10μlを加えることにより各ウェルに施した。この溶液を37℃にて90分間培養した。これらプレートをPBSで4回洗浄した後、基質ヘタノールアミン緩衝液(pH9.5)に於けるp-ニトロフェニルホスフェート(Sigma社製)の0.4mg/ml溶液100μlを加えた。この基質を37℃にて90分間培養した発色させた。

【0137】各ウェルのA₄₅₀を1.5の閾域、1.0の較正值及び0.0001に設定したPBS(Blank)ウェルに於ける0.5%BSAにセットしたマイクロエリサ・オート・リーダー(Microelisa Auto Reader, Dynatech社製)により読み取った。A₄₅₀のデータをVAX系に於けるRS-1で表にし、標準曲線データを4パラメータのロジスチックモデルに当てはめた。未知試料の濃度をA₄₅₀データに基いて算出した。

【0138】E. 3. 組換え抗体の再編成及び分析

上記E. 1. 10に記載したように、作成した凍結細胞を冷溶菌緩衝液(10mMトリスHCl(pH7.5), 1mMEDTA, 0.1M NaCl, 1mM弗化フェニルメチルスルホニル(PMSF))に於いて解凍させ、音波処理で溶菌させた。溶菌物を3,000rpmにて20分間の遠心分離により部分清澄化させた。1mMPMSFを追加 *

*して蛋白質分解酵素から上清を保護し、直ちに使用するか又は-80℃で凍結保存した。凍結溶菌物は、決して2回以上解凍させなかった。

【0139】E. coliで産生した抗-CEAH鎖(γ)のS-スルホン化物を次のように作成した:不溶性物体としてH鎖を含有するpγCEAtrp207-1*で形質転換させた組換えE. coli細胞を溶菌し、上記と同様に遠心分離した。ペレットを同じ緩衝液中に再懸濁させ、音波処理し、再遠心分離した。このペレットを緩衝液で1回洗浄し、6Mグアニジン塩酸塩, 0.1MトリスHCl(pH8), 1mMEDTA, 20mg/ml亜硫酸ナトリウム及び10mg/mlテトラチオン酸ナトリウムに懸濁させ、25℃にて約16時間反応させた。反応混合物を8M尿素, 0.1MトリスHCl(pH8)に対し、透析し、4℃で貯蔵してγ-SSO₃の3mg/ml溶液を得た。

【0140】各種のIgG鎖を産生する各種のE. coli菌株の細胞から得られる細胞溶菌物650μlを500mgの尿素に加えた。これに20mMまでのβ-メルカプトエタノールと50mMまでのトリスHCl(pH8.5)と、1mMまでのEDTAとを加え、また或る実験ではγ-SSO₃を0.1mg/mlまで加えた。25℃で30~90分間静置した後、この反応混合物を4℃にて0.1Mグリシン酸ナトリウム(pH10.8), 0.5M尿素, 10mMグリシンエチルエステル, 5mM還元グルタチオン, 0.1mM酸化グルタチオンから成り、緩衝液に対して透析した。この緩衝液をN飽和した水から調製し、透析を蓋付ウィートン瓶にて行なった。16~48時間後、透析袋を1mMPMSFを含有する4℃の燐酸塩緩衝液に移し、更に16~24時間透析を続けた。透析物をE. 2に記載したようにCEAを結合する能力につきELISAによって分析した。下記の結果は標準曲線と比較して得られた数値をng/ml抗-CEAとして示す。更に、ELISA反応マイナスκ鎖のみを産生する細胞のバックグラウンド(108ng/ml)から、及び反応混合物に於けるγ及びκ鎖のレベルの推定値から計算した再編成効率をも示す。

【0141】

	ng/ml	組換え
抗-CEA		%
IFN-αAを産生するE. coli W3110(比較)	0	—
E. coli(W3110/pKCEAtrp207-1*)	108	—
E. coli(W3110/pKCEAtrp207-1*)		
+ γ-SSO ₃	848	0.33
E. coli(W3110/pKCEAtrp207-1*Δ,		
pγCEAInt2)	1580	0.76
ハイブリドーマ抗-CEA κ-SSO ₃		
及びγ-SSO ₃	540	0.40

【0142】E. 4. キメラ抗体の作成

図31及び図32はネズミ抗CEA可変領域とヒトγ2

不変領域とから成るキメラH(γ)鎖のための発現ベクターの作成を示している。

【0143】ヒト γ 2H鎖をコード化するDNA配列は次のように作成される:ヒト多発性骨髄腫細胞系から標準技術により得たcDNAライブラリーを5'GGGCACTCGACACAA3'で検索して、ヒト γ 2鎖に対するcDNA挿入物を含有するプラスミドを得(Takahashi et al., Cell, 29:671(1982))(この文献を引用して本明細書に包含する)、分析してヒト γ 2に於ける公知配列によりこれを同定する(J. Ellison et al., Proc. Natl. Acad. USA, 79:1984(1982))(この文献を引用して本明細書に包含する)。

【0144】図31に示したように、クローン化ヒト γ 2プラスミド(p γ 2)から2つの断片が得られる。第1の断片は、PvuIIによる消化に続きAvaIIIでの消化及び不変領域の部分に勧誘する小さいDNA断片の6%PAGEを用いる精製によって生ぜしめる。第2の断片は、p γ 2を γ 2の3'未翻訳領域に於いて開裂する(ヌクレオチド配列から推定される)制限酵素で消化し、Klenow及びdNTPを充填し、AvaIIIで開裂させて、6%PAGEを用いて小さい方の断片を単離することにより得られる。(PvuII-3'未翻訳断片を供給するための2工程且つ2断片の組成物の選択は、3末端に対しAvaIII部位が近接するため産生物に対する明確な経路を与え、従って3'未翻訳領域部位に適合する遺伝子配列に於ける制限部位を更に必要としない。)p γ CEA207-1をEcoRIで消化し、Klenow及びdNTPで処理して付着性末端充填し、PvuIIで消化し、この場合大きいベクター断片は6%PAGEにより単離されたプロモーターを含有する。

【0145】ネズミ γ 1遺伝子に於けるPvuII部位を包囲する位置及びDNA配列は、ヒト γ 2遺伝子に於けるPvuII部位を包囲する位置及びDNA配列と同一である。

【0146】上記断片の3方向結合から得られるプラスミド(pChim1)は、trpプロモーターの影響下で、ネズミ抗-CEA γ 1鎖の可変領域及び不変領域の1部並びに γ 2ヒト鎖の1部を含有する。事実、pChim1は、E. coliに形質転換させた場合、キメラH鎖を発現するが、ネズミからヒトへの変化は可変領域対不変領域の接合部に於いて生じないものである。

【0147】図32は発現により生ずる蛋白質がネズミ抗-CEA抗体からの可変領域とヒト γ 2鎖からの不変領域とを含有するようにpChim2を作成するためのpChim1の改変を示している。まず、NcoIで処理し、Klenow及びdNTPで平滑末端化させ、PvuIIにより開裂させ、ネズミ抗-CEAに対する一定コード化領域に於ける短セグメントを除き、殆んど完全プラスミドである大型ベクター断片を単離することにより、pChim1から断片を作成する。PvuIIで処理し、可変領域で開裂する任意の制限酵素で処理し、Klenow及びdNTPで平滑末端化し、この連鎖の可変領域と不変領域との間の接合

部から成る短い断片を単離することにより、上記のp γ 2から第2の断片を作成する。

【0148】上記2つの断片を結合すれば、中間的プラスミドが得られ、このプラスミドはネズミ抗-CEA抗原の不変領域の小部分と、ヒト γ 鎖の可変領域の小部分とを含有する外来DNA断片以外には正確である。この修復はXbaI-PvuIIの断片を切断しMessing et al., Nucleic acids Res., 9:309(1981)に記載されたM13ファージ中へクローン化させ、次いでAdelman et al., DNA, 2:183(1983)に記載されたように試験管内に於ける部位指向性の削除突然変異によって行なった。このように改変させたXbaI-PvuII断片を再び中間プラスミドに結合してpChim2を生成させる。このプラスミドは適当な宿主に於いて、明確に作成されたネズミ可変領域/ヒト不変領域キメラH鎖を発現することができる。

【0149】同様に、 γ 鎖でなくヒト κ 鎖に対するcDNA作成のためのmRNA鋳型を使用してキメラL鎖のための発現プラスミドを作成する。

【0150】次いで、上記2つのプラスミドをE. coli W3110に二重形質転換させ、これら細胞を増殖させ、上記E. 1-E. 3に示したように連鎖を再編成する。

【0151】E. 5. 改変ネズミ抗-CEA抗体の作成
E. 5. 1. 改変ネズミ抗-CEAH鎖遺伝子の直接発現用プラスミドベクターの作成

ネズミ抗-CEAH鎖の不変領域に於けるアミノ酸216-230の区域のシステイン残基及び得られるジスルフィド結合は、補体結合に對し重要であると思われる(Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78:524(1981))が、得られる抗体の抗原結合性にとっては重要でない。本発明の方法による再編成の際、不正確なジスルフィド結合形成の可能性を減少させるため、3個のシステインに対するコドンを含むアミノ酸残基236-232をコードするヌクレオチドを次のようにして欠失する:

【0152】「デリーター(deleter, 欠失剤)」デオキシオリゴヌクレオチド即ち5'CTAACACCATGTCAGGGTを使用して、Wallace et al., Science, 209:1396(1980)の方法又はAdelman et al., DNA, 2:183(1983)の方法によってp γ CEAtrp207-1*から遺伝子の適切な部分を欠失させる。要するに、「デリーター」デオキシオリゴヌクレオチドを変性p γ CEAtrp207-1*DNAと共にアニールし、プライマー修復合成をin vitroで行ない、次いでP³²標識したデリーター配列と推定欠失クローンとのハイブリゼーションにより選別(screening)する。

【0153】E. 5. 2. システイン欠如改変抗体の產生

E. 5. 1. で作成したプラスミドを用いて、上記のよ

うに予めpKCEAtrp207-1*で形質転換したE. coli菌株を形質転換する。これら細胞を増殖させ、組換抗体鎖を抽出し、E. 1. 10.に記載したように改変抗体を再編成する。

【0154】E. 6. Fabの作成

E. 6. 1. ネズミ抗-CEAγ1 Fab断片遺伝子の直接発現用プラスミドベクターの作成:pγCEAFabtrp207-1*

図33はpγCEAFabtrp207-1*の作成を示している。5μgのpBR322をHindIIIで消化し、Klenow及びdNTPで処理して付着性末端を平滑化し、PstIで消化し、BAPで処理した。大ベクター断片、即ち断片Iを6%PAGEを用い、電気泳出することにより回収した。

【0155】5μgのpγCEAtrp207-1をBamHI及びPstIの両方で消化し、trpプロモーターと、可変領域をコードし不変領域まで続き更に抗-CEAγ1鎖のヒンジ領域まで続く遺伝子配列とを含有する約1570bpのDNA断片(断片II)を単離し、電気泳動の後に精製した。

【0156】完全H鎖でなく、抗-CEAγ1鎖Fab断片が発現されるためには、停止コドンが遺伝子中の適当な位置に作成されることが必要である。このため、20μgのpγ298から260bpのNcoI-NdeI DNA断片を単離し、精製した。13ヌクレオチドDNAプライマー、即ちその相補鎖がFab遺伝子の最後の3個のC-末端アミノ酸と停止コドンに対し必要とされる3個のうち2個の塩基とをコードするものをホスホトリエステル法(上記)によって合成した。このプローブはヌクレオチド754-767(図9、図10、図11、図12、図13および図14)にハイブリダイズし、これは次の配列を有する:

Asp Cys Gly Stop
5' GGGATTGTTGGTTG3'

【0157】停止コドンの第3塩基を上記のpBR322開裂物の充填HindIII部位の末端ヌクレオチドにより供給する。このプライマー500ngを、20μl中に0.5mMのATPを含有する10ユニットのT4DNAキナーゼを用いる反応液中の5'末端のリン酸化によりプライマー修復反応に使用し、これを約200ngのNcoI-NdeI DNA断片と混合した。混合物を95℃で3分間加熱変性させ、ドライアイスエタノール中で急冷した。この変性したDNA溶液を60mM NaCl, 7mM MgCl₂, 7mM トリスHCl(pH 7.4), 12mMの各dNTPとなし、12ユニットのDNAポリメラーゼI-大断片を加えた。37℃で2時間インキュベーションした後、このプライマー修復反応物をフェノール/CHCl₃で抽出し、エタノール沈澱し、BamHIで消化し、反応物を6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動にかけた。181bp平滑末端-BamHIのDNA断片、即

ち断片IIIの約50ngを単離し、精製した。

【0158】約100ngの断片Iとそれぞれ約100ngの断片II及びIIIを1晩結合させ、E. coli K12菌株294に形質転換した。数種のテトラサイクリン耐性形質転換体からのプラスミドDNAを適正な構成のものにつき分析し、修復平滑末端充填HindIII接合部を介するヌクレオチド配列を決定してTGA停止コドンを実証した。

【0159】E. 6. 2. Fab蛋白質の産生

E. 6. 1で作成したプラスミドを上記のように予めpKCEAtrp207-1*で形質転換したE. coli菌株を形質転換する。これら細胞を増殖させ、組換抗体鎖につき抽出し、Fab蛋白質をE. 1. 10に記載したように再編成する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 免疫グロブリンの一般的構造図を示す図である。

【図2】 κ抗CEA鎖をコードするpK17G4のcDNA挿入物の詳細な配列を示す図である。

【図3】 κ抗CEA鎖をコードするpK17G4のcDNA挿入物の詳細な配列を示す図である。

【図4】 κ抗CEA鎖をコードするpK17G4のcDNA挿入物の詳細な配列を示す図である。

【図5】 κ抗CEA鎖をコードするpK17G4のcDNA挿入物の詳細な配列を示す図である。

【図6】 対応するアミノ酸配列と共に示した図2、図3、図4および図5の断片のコード配列を示す図である。

【図7】 対応するアミノ酸配列と共に示した図2、図3、図4および図5の断片のコード配列を示す図である。

【図8】 対応するアミノ酸配列と共に示した図2、図3、図4および図5の断片のコード配列を示す図である。

【図9】 γ抗CEA鎖をコードするpγ298及びpγ11のcDNA挿入物の結合詳細配列を示す図である。

【図10】 γ抗CEA鎖をコードするpγ298及びpγ11のcDNA挿入物の結合詳細配列を示す図である。

【図11】 γ抗CEA鎖をコードするpγ298及びpγ11のcDNA挿入物の結合詳細配列を示す図である。

【図12】 γ抗CEA鎖をコードするpγ298及びpγ11のcDNA挿入物の結合詳細配列を示す図である。

【図13】 γ抗CEA鎖をコードするpγ298及びpγ11のcDNA挿入物の結合詳細配列を示す図である。

【図14】 γ抗CEA鎖をコードするpγ298及びpγ11のcDNA挿入物の結合詳細配列を示す図である。

る。

【図15】 図9、図10、図11、図12、図13および図14の断片によりコードされた対応アミノ酸配列を示す図である。

【図16】 図9、図10、図11、図12、図13および図14の断片によりコードされた対応アミノ酸配列を示す図である。

【図17】 図9、図10、図11、図12、図13および図14の断片によりコードされた対応アミノ酸配列を示す図である。

【図18】 図9、図10、図11、図12、図13および図14の断片によりコードされた対応アミノ酸配列を示す図である。

【図19】 図9、図10、図11、図12、図13および図14の断片によりコードされた対応アミノ酸配列を示す図である。

【図20】 κ 及び γ 抗-CEA 鎖に対する発現ベクターの作成概略を示す図である。

【図21】 κ 及び γ 抗-CEA 鎖に対する発現ベクターの作成概略を示す図である。

【図22】 κ 及び γ 抗-CEA 鎖に対する発現ベクターの作成概略を示す図である。

【図23】 κ 及び γ 抗-CEA 鎖に対する発現ベクターの作成概略を示す図である。

【図24】 κ 及び γ 抗-CEA 鎖に対する発現ベクターの作成概略を示す図である。

*

* 【図25】 κ 及び γ 抗-CEA 鎖に対する発現ベクターの作成概略を示す図である。

【図26】 γ 鎖, κ 鎖及びこれら両者に対する遺伝子を発現する *E. coli* 抽出物につき行なったサイジングゲル操作の結果を示す薄膜上に形成された微細なパターンを表している写真である。

【図27】 γ 鎖, κ 鎖及びこれら両者に対する遺伝子を発現する *E. coli* 抽出物につき行なったサイジングゲル操作の結果を示す薄膜上に形成された微細なパターンを表している写真である。

【図28】 γ 鎖, κ 鎖及びこれら両者に対する遺伝子を発現する *E. coli* 抽出物につき行なったサイジングゲル操作の結果を示す薄膜上に形成された微細なパターンを表している写真である。

【図29】 図26、図27および図28と同様に形質転換された細胞抽出物のウェスタンブロットの結果を示す薄膜上に形成された微細なパターンを表している写真である。

【図30】 抗CEA活性のELISA分析に対する標準曲線図である。

【図31】 キメラH鎖をコードする遺伝子の発現に対するプラスミドの作成図である。

【図32】 キメラH鎖をコードする遺伝子の発現に対するプラスミドの作成図である。

【図33】 H鎖のFab領域をコードする遺伝子の発現に対するプラスミドの作成図である。

【図2】

```

1      GTTGTCTGTGG TTGTCTGGTG TTGAAGGAGA CATTGTGATG ACCCAGTCTC
      CAACGACACC AACAGACCAC AACTTCCTCT GTAACACTAC TGGGTCAAGG

      tth111
      haeIII
      haeI
      ACAAATTCAT GTCCACATCA GTAGGAGACA GGGTCAGCAT CACCTGCAAG
      TGTTTAAGTA CAGGTGTAGT CATCCTCTGT CCCAGTCGTA GTGGACGTTT
      sfaNI

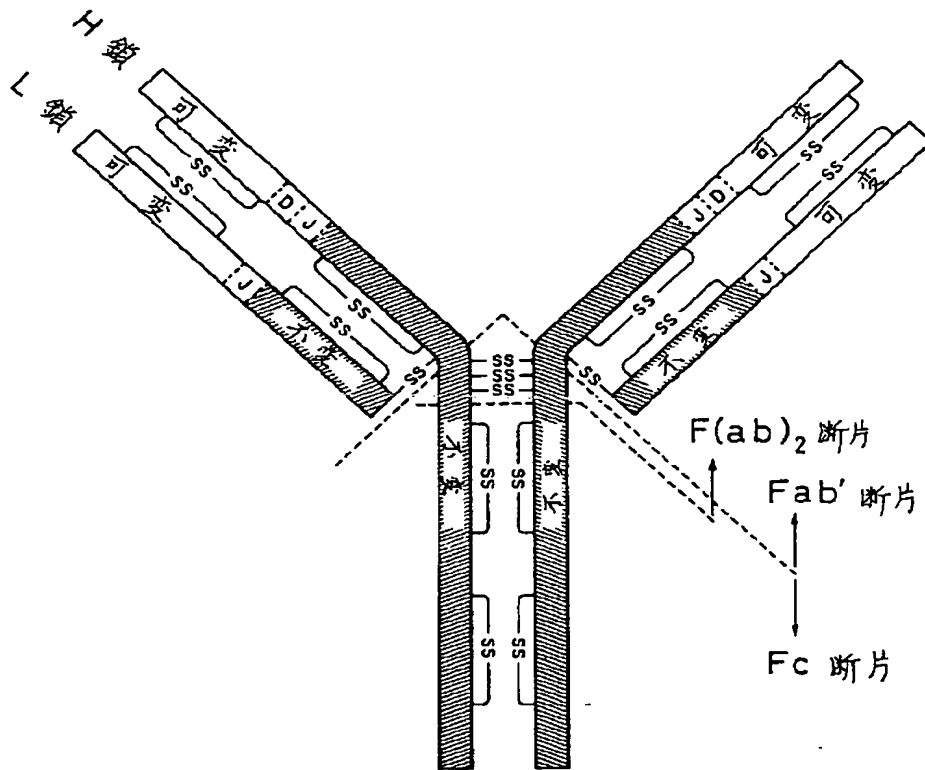
      fnu4HI      scrFI      scrFI
      bbv      ecorII      ecorII
101    GCCAGTCAGG ATGTGGGTGC TGCTATAGCC TGGTATCAAC AGAAACCAGG
      CCGTCAGTCC TACACCCACG ACGATATCGG ACCATAGTTG TCTTTGGTCC

      scrFI
      ncII
      hpaII      hinfI
      ACAATCTCCT AACTACTGA TTTACTGGGC ATCCACCCGG CACACTGGAG
      TGTTAGAGGA TTTGATGACT AAATGACCCG TAGGTGGGCC GTGTGACCTC
      fokI      sfaNI

      sau3A      xhoI      hphI
      dpnI      sau3A      dpnI
201    TCCCTGATCG CTTCACAGGC AGTGGATCTG GGACAGATT CACTCTCACC
      AGGGACTAGC GAAGTGTCCG TCACCTAGAC CCTGTCTAAA GTGAGAGTGG

```

【図1】



【図3】

```

ATTAGCAATG TGCAGTCTGA TGACTTGGCA GATTATTTCT hincII GTCAACAATA
TAATCGTTAC ACGTCAGACT ACTGAACCGT CTAATAAAGA CAGTTGTTAT

301 TAGCGGGTAT mnII sau96
      CCTCTCACGT TCGGTGCTGG GACCAAGCTG GAGCTGAAAC
      ATCGCCCATG GGAGAGTGCA AGCCACGACC CTGGTTCGAC CTCGACTTTG

      fnu4HI mboII hpaI
      GGGCTGATGC TGCACCAACT GTATCCATCT TCCCACCATC CAGTGAGCAG hincII
      CCCGACTACG ACGTGGTTGA CATAGGTAGA AGGGTGGTAG GTCACTCGTC
      foki

401 TTAACATCTG mnII ddeI xmni
      GAGGTGCCTC AGTCGTGTGC TTCTTGAACA ACTTCTACCC
      AATTGTAGAC CTCCACGGAG TCAGCACACG AAGAACTTGT TGAAGATGGG

      mboII acyI
      CAAAGACATC AATGTCAAGT GGAAGATTGA TGGCAGTGAA CGACAAAATG
      GTTTCTGTAG TTACAGTTCA CTTTCTAACT ACCGTCAGTT GCTGTTTTAC

```

【図4】

sau3A
 dpnI
 hgaI bclI
 501 GCGTCCTGAA CAGTTGGACT GATCAGGACA GCAAAGACAG CACCTACAGC
 C6CAGGACTT GTCAACCTGA CTAGTCCTGT CGTTTCTGTC GTGGATGTCG

fnu4HI
 bbv mnlI hincII aluI
 ATGAGCAGCA CCCTCACGTT GACCAAGGAC GAGTATGAAC GACATAACAG
 TACTCGTCGT GGGAGTGCAA CTGGTTCCTG CTCATACTTG CTGTATTGTC

mnlI
 haeIII
 haeI hphI aluI
 601 CTATACCTGT GAGGCCACTC ACAAGACATC AACTTCACCC ATTGTCAAGA
 GATATGGACA CTCCGGTGAG TGTCTGTAG TTGAAGTGGG TAACAGTTCT

sau96 hgaI
 ddeI
 avall acyl
 GCTTCAACAG GAATGAGTGT TAGAGACAAA GGTCTGAGA CGCCACCACC
 CGAAGTTGTC CTTACTCACA ATCTCTGTTT CCAGGACTCT GC6GTG6TGG

【図5】

aluI aluI mboII ddeI mnlI
 701 AGCTCCCCAG CTCCATCCTA TCTTCCCTTC TAAGGTCTTG GAGGCTTCCC
 TCGAGGGGTC GAGGTAGGAT AGAAGGGAAG ATTCCAGAAC CTCCGAAGGG
 fokI

hgiA mnlI mnlI
 CACAAGCGAC CTACCACTGT TGCGGTGCTC CAAACCTCCT CCCACCTCC
 GTGTTGCTG GATGGTGACA ACGCCACGAG GTTTGGAGGA GGGGTGGA66

mnlI
 mnlI mnlI xmnI
 801 TTCTCCTCCT CCTCCCTTTC CTTGGCTTTT ATCATGCTAA TATTTGCAGA
 AAGAGGAGGA GGAGGGAAAG GAACCGAAAA TAGTACGATT ATAAACGTCT

hinfI
 AAATATTCAA TAAAGTGAGT CTTTGCACTT GA
 TTTATAAGTT ATTTCACTCA GAAACGTGAA CT

【図6】

```

      -9                                1
    leu leu trp leu ser gly val glu gly asp ile val met thr
G   UUG CUG UGG UUG UCU GGU GUU GAA GGA GAC AUU GUG AUG ACC

      10                                20
    gln ser his lys phe met ser thr ser val gly asp arg val ser
CAG UCU CAC AAA UUC AUG UCC ACA UCA GUA GGA GAC AGG GUC AGC

      30
    ile thr cys lys ala ser gln asp val gly ala ala ile ala trp
AUC ACC UGC AAG GCC AGU CAG GAU GUG GGU GCU GCU AUA GCC UGG

      40                                50
    tyr gln gln lys pro gly gln ser pro lys leu leu ile tyr trp
UAU CAA CAG AAA CCA GGA CAA UCU CCU AAA CUA CUG AUU UAC UGG

      60
    ala ser thr arg his thr gly val pro asp arg phe thr gly ser
GCA UCC ACC CGG CAC ACU GGA GUC CCU GAU CGC UUC ACA GGC AGU

      70                                80
    gly ser gly thr asp phe thr leu thr ile ser asn val gln ser
GGA UCU GGG ACA GAU UUC ACU CUC ACC AUU AGC AAU GUG CAG UCU

```

【図7】

```

      90
    asp asp leu ala asp tyr phe cys gln gln tyr ser gly tyr pro
GAU GAC UUG GCA GAU UAU UUC UGU CAA CAA UAU AGC GGG UAU CCU

      100                                110
    leu thr phe gly ala gly thr lys leu glu leu lys arg ala asp
CUC ACG UUC GGU GCU GGG ACC AAG CUG GAG CUG AAA CGG GCU GAU

      120
    ala ala pro thr val ser ile phe pro pro ser ser glu gln leu
GCU GCA CCA ACU GUA UCC AUC UUC CCA CCA UCC AGU GAG CAG UUA

      130                                140
    thr ser gly gly ala ser val val cys phe leu asn asn phe tyr
ACA UCU GGA GGU GCC UCA GUC GUG UGC UUC UUG AAC AAC UUC UAC

      150
    pro lys asp ile asn val lys trp lys ile asp gly ser glu arg
CCC AAA GAC AUC AAU GUC AAG UGG AAG AUU GAU GGC AGU GAA CGA

      160                                170
    gln asn gly val leu asn ser trp thr asp gln asp ser lys asp
CAA AAU GGC GUC CUG AAC AGU UGG ACU GAU CAG GAC AGC AAA GAC

```


【図8】

```

                                180
s r thr tyr ser met ser ser thr leu thr leu thr lys asp glu
AGC ACC UAC AGC AUG AGC AGC ACC CUC ACG UUG ACC AAG GAC GAG

                                190
tyr glu arg his asn ser tyr thr cys glu ala thr his lys thr
UAU GAA CGA CAU AAC AGC UAU ACC UGU GAG GCC ACU CAC AAG ACA

                                200
ser thr ser pro ile val lys ser phe asn arg asn glu cys AM
UCA ACU UCA CCC AUU GUC AAG AGC UUC AAC AGG AAU GAG UGU UAG

                                210
                                214
AGACAAAGGUCCUGAGACGCCACCACCAGCUCUCCCAUCCUAUCUUCUCCUUCUAA
GGUCUUGGAGGCUUCCCCACAAGCGACCUACCACUGUUGCGGUGCUCCAAACCUCUCC
CCACCUCUUCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUUGGCUUUUAUCAUGCUAAUAUUUGCAGAAAA
UAUUCAAUAAAGUGAGUCUUUGCACUUGA

```

【図9】

```

                                sau96                                ddeI
                                avaII mnlI                                aluI
1  hinfI                                GAGTCAGCAC TGAACACGGA CCCCTCACGA TGAACCTCGG GCTCAGCTTG
                                CTGAGTCGTG ACTTGTGCCT GGGGAGTGCT ACTTGAAGCC CGAGTCGAAC

                                ahaIII                                sfaNI
                                ATTTACCTTG TCCTTGTTTT AAAAGTTGTC CAGTGTGAAG TGATGCTGGT
                                TAAATGGAAC AGGAACAAAA TTTTCAACAG GTCACACTTC ACTACGACCA

                                scrFI sau96
                                mnlI
101 hinfI hinfI ecoRII avaII
                                GGAGTCTGGG GGAGTCTTAA TGGAGCCTGG AGGGTCCCTG AACTCTCCT
                                CCTCAGACCC CCTCAGAATT ACCTCGGACC TCCCAGGGAC TTTGAGAGGA

                                fnu4HI
                                bbv mnlI hinfI
                                GTGCAGCCTC TGGATTCACT TTCAGTAGAT ATGCCATGTC TGGGGTTCGC
                                CACGTCGGAG ACCTAAGTGA AAGTCATCTA TACGGTACAG AACCCAAGCG

                                hpaII mnlI
                                hinfI mboII
201 CAGACTCCGG AGAAGAGGCT GGAGTGGGTC GCAACCATTA GTAGTGGTGG
                                GTCTGAGGCC TCTTCTCCGA CCTCAGCCAG CGTTGGTAAT CATCACCACC

```

【図10】

TAGTTCACAC CTTCCATCCA GACAGTGTGA AGGGCGATTG ACCATCTCCA
 ATCAAGTGTG GAAGGTAGGT CTGTCACT TCCCGCTAAG TGGTAGAGGT
 fokI

301 GAGACAATGC CAAGAACC CTGTACCTGC AAATGAGCAG TCTGAGGTCT
 CTCTGTTACG GTTCTTGTGG GACATGGACG TTTACTCGTC AGACTCCAGA

GAGGACACGG CCATGTATTA CTGTGCAAGA CCCCCTCTTA TTTCGTTAGT
 CTCTGTGCC GGTACATAAT GACACGTTCT GGGGAGAAAT AAAGCAATCA

401 AGCGGACTAT GCTATGGACT ACTGGGGTCA AGGAACCTCA GTACCGTCT
 TCGCTGATA CGATACCTGA TGACCCAGT TCCTGGAGT CAGTGGCAGA

CCTCAGCCAA AACGACACCC CCATCTGTCT ATCCACTGGC CCCTGGATCT
 GGAGTCGGT TTGCTGTGGG GGTAGACAGA TAGGTGACCG GGGACCTAGA

【図11】

501 GCTGCCCAA CTAACCTCAT GGTGACCTG GGATGCCTGG TCAAGGGCTA
 CGACGGGTTT GATTGAGGA CCACTGGGAC CTAACGGACC AGTTCCCGAT

TTTCCTGAG CCAGTGACAG TGACCTGGAA CTCTGGATCC CTGTCCAGCG
 AAAGGGACTC GGTCACTGTC ACTGGACCTT GAGACCTAGG GACAGGTGCG

601 GTGTGCACAC CTTCCAGCT GTCCTGCAGT CTGACCTCTA CACTCTGAGC
 CACAGTGTG GAAGGGTCGA CAGGACGTCA GACTGGAGAT GTGAGACTCG

AGCTCAGTGA CTGTCCCTC CAGCCCTCGG CCCAGCGAGA CCCTCAGCTG
 TCGAGTCACT GACAGGGGAG GTCGGGAGCC GGGTCGCTCT GGCAGTGGAC

701 CAACGTTGCC CACCCGGCCA GCAGCACCAA GGTGGACAAG AAAATTGTGC
 GTTGAACGG GTGGGCGGT CGTCGTGGT CCACCTGTTC TTTAACACG

【図12】

```

scrFI
ecoRII
CCAGGGATTG TGGTTGTAAG CCTTGCATAT GTACAGTCCC AGAAGTATCA
GGTCCCTAAC ACCAACATTC GGAACGTATA CATGTCAGGG TCTTCATAGT

                                ndeI   rsal
                                hphI
801  mboII mboII          fokI hgiA
      TCTGTCTTCA TCTTCCCCC AAAGCCCAAG GATGTGCTCA CCATTACTCT
      AGACAGAAGT AGAAGGGGGG TTTCGGGTTT CTACACGAGT GGTAATGAGA

                                mstII          sau3A
                                hinfI          dpnI mnlI
                                ddeI          accI          fokI          auaI
      GACTCCTAAG GTCACGTGTG TTGTGGTAGA CATCAGCAAG GATGATCCCG
      CTGAGGATTC CAGTGCACAC AACACCATCT GTAGTCGTTT CTAATAAGGC

      sau96      pvuII          mnlI          ddeI
      auaI      aluI          hgiA          aluI hgaI
901  AAGTCCAGTT CAGCTGGTTT GTAGATGATG TGGAGGTGCA CACAGCTCAG
      TCCAGGTCAA GTCGACCAA CATCTACTAC ACCTCCAGGT GTGTCCAGTC

      smaI
      scrFI
      scrFI
      nciI
      nciI
      hpaII
      auaI mnlI          ddeI
      ACGCAACCCC GGGAGGAGCA GTTCAACAGC ACTTTCGCT CAGTCAGTGA
      TCGTTGGGG CCTCCTCGT CAAGTTGTCG TGAAGGCGA GTCAGTCACT

```

【図13】

```

scrFI
ecoRII
1001 ACTTCCCATC ATGCACCAGG ACTGGCTCAA TGGCAAGGAG TTCAAATGCA
      TGAAGGGTAG TACGTGGTCC TGACCGAGTT ACCGTTCTC AAGTTTACGT

                                fnu4HI
                                bbv
                                hincII          aluI          taqI
      GGGTCAACAG TGCAGCTTTC CCTGCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA
      CCCAGTTGTC ACCTCGAAAG GGACGGGGT AGCTCTTTT GTAGAGGTTT

                                rsal          mnlI
1101 ACCAAAGGCA GACCGAAGGC TCCACAGGTG TACACCATTC CACCTCCCAA
      TGGTTTCCGT CTGGCTTCCG AGGTGTCCAC ATGTGGTAAG GTGGAGGGTT

                                haeIII
                                haeI
                                balI
      GGAGCAGATG GCCAAGGATA AAGTCAGTCT GACCTGCATG ATAACAGACT
      CCTCGTCTAC CGGTTCTAT TTCAGTCAGA CTGGACGTAC TATTGTCTGA

                                fnu4HI
                                bbv
1201 mboII mboII          fnu4HI
      TCTTCCCTGA AGCATTACT GTGGAGTGGC AGTGAATGG GCAGCCAGCG
      AGAAGGGACT TCTGTAATGA CACCTACCG TCACCTTACC CGTCGGTCCG

```

【図14】

ddeI
 GAGAACTACA AGAAGACTCA GCCCATCATG AACACGAATG GCTCTTACTT
 CTCTTGATGT TCTTGTGAGT CGGGTAGTAC TTGTGCTTAC CGAGAATGAA

1301 accI aluI mboII mnlI
 CGTCTACAGC AAGCTCAATG TGCAGAAGAG CAACTGGGAG GCAGGAAATA
 GCAGATGTGG TTGAGATTAC ACGTCTTCTC GTTGACCTC CGTCCTTTAT

sau96
 mnlI haeIII mboII
 hphI
 CTTTCACCTG CTCTGTGTTA CATGAGGGCC TGCACAACCA CCATACTGAG
 GAAAGTGGAC GAGACACAAT GTACTCCCGG ACGTGTGGT GGTATGACTC

1401 mnlI scrFI sau3A mnlI
 ecorII dpnI
 AAGAGCCTCT CCCACTCTCC TGGTAAATGA TCCCAGTGTC CTTGGAGCCC
 TTCTCGGAGA GGGTCAGAGC ACCATTTACT AGGTCACAG SAACCTCGGC

sau96
 hinfI mnlI mnlI
 avaII
 TCTGGTCCTA CAGGACTCTG ACACCTACCT CCACCCCTCC CTGTATAAT
 AGACCAGGAT GTCCTGAGAC TGTGGATGGA GGTGGGGAGG GACATATTTA

1501 AAAGCACCCA GCACTGCCTT GGGAAAAA
 TTTCTGGGT CGTGACGGAA CCCTTTTT

【図15】

met asn phe gly leu ser
 GAGUCAGCACUGAACACGGACCCCUACG AUG AAC UUC GGG CUC AGC

-10 1
 leu ile tyr leu val leu val leu lys val val gln cys glu
 UUG AUU UAC CUU GUC CUG GUU UUA AAA GUU GUC CAG UGU GAA

10
 val met leu val glu ser gly gly val leu met glu pro gly gly
 GUG AUG CUG GUG GAG UCU GGG GGA GUC UUA AUG GAG CCU GGA GGG

20 30
 ser leu lys leu ser cys ala ala ser gly phe thr phe ser arg
 UCC CUG AAA CUC UCC UGU GCA GCC UCU GGA UUC ACU UUC AGU AGA

40
 tyr ala met ser trp val arg gln thr pro glu lys arg leu glu
 UAU GCC AUG UCU UGG GUU CGC CAG ACU CCG GAG AAG AGG CUG GAG

50 60
 trp val ala thr ile ser ser gly gly ser ser his leu pro ser
 UGG GUC GCA ACC AUU AGU AGU GGU GGU AGU UCA CAC CUU CCA UCC

【図16】

```

              70
arg gln cys glu gly arg phe thr ile ser arg asp asn ala lys
AGA CAG UGU GAA GGG CGA UUC ACC AUC UCC AGA GAC AAU GCC AAG

              80
asn thr leu tyr leu gln met ser ser leu arg ser glu asp thr
AAC ACC CUG UAC CUG CAA AUG AGC AGU CUG AGG UCU GAG GAC ACG

              90
ala met tyr tyr cys ala arg pro pro leu ile ser leu val ala
GCC AUG UAU UAC UGU GCA AGA CCC CCU CUU AUU UCG UUA GUA GCG

              100
asp tyr ala met asp tyr trp gly gln gly thr ser val thr val
GAC UAU GCU AUG GAC UAC UGG GGU CAA GGA ACC UCA GUC ACC GUC

              110
ser ser ala lys thr thr pro pro ser val tyr pro leu ala pro
UCC UCA GCC AAA ACG ACA CCC CCA UCU GUC UAU CCA CUG GCC CCU

              120
gly ser ala ala gln thr asn ser met val thr leu gly cys leu
GGA UCU GCU GCC CAA ACU AAC UCC AUG GUG ACC CUG GGA UGC CUG

```

【図17】

```

              160
val lys gly tyr phe pro glu pro val thr val thr trp asn ser
GUC AAG GGC UAU UUC CCU GAG CCA GUG ACA GUG ACC UGG AAC UCU

              170
gly ser leu ser ser gly val his thr phe pro ala val leu gln
GGA UCC CUG UCC AGC GGU GUG CAC ACC UUC CCA GCU GUC CUG CAG

              180
ser asp leu tyr thr leu ser ser ser val thr val pro ser ser
UCU GAC CUC UAC ACU CUG AGC AGC UCA GUG ACU GUC CCC UCC AGC

              190
pro arg pro ser glu thr val thr cys asn val ala his pro ala
CCU CGG CCC AGC GAG ACC GUC ACC UGC AAC GUU GCC CAC CCG GCC

              200
ser ser thr lys val asp lys lys ile val pro arg asp cys gly
AGC AGC ACC AAG GUG GAC AAG AAA AUU GUG CCC AGG GAU UGU GGU

              210
cys lys pro cys ile cys thr val pro glu val ser ser val phe
UGU AAG CCU UGC AUA UGU ACA GUC CCA GAA GUA UCA UCU GUC UUC

```

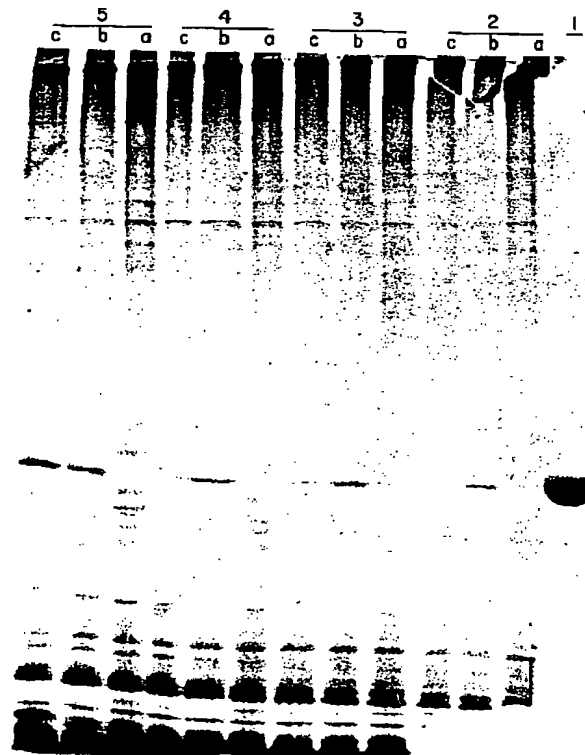
【図18】

250
 ile phe pro pro lys pro lys asp val leu thr ile thr leu thr
 AUC UUC CCC CCA AAG CCC AAG GAU GUG CUC ACC AUU ACU CUG ACU
 260
 pro lys val thr cys val val val asp ile ser lys asp asp pro
 CCU AAG GUC ACG UGU GUU GUG GUA GAC AUC AGC AAG GAU GAU CCC
 270
 glu val gln phe ser trp phe val asp asp val glu val his thr
 GAG GUC CAG UUC AGC UGG UUU GUA GAU GAU GUG GAG GUG CAC ACA
 280
 ala gln thr gln pro arg glu glu gln phe asn ser thr phe arg
 GCU CAG ACG CAA CCC CGG GAG GAG CAG UUC AAC AGC ACU UUC CCG
 290
 ser val ser glu leu pro ile met his gln asp trp leu asn gly
 UCA GUC AGU GAA CUU CCC AUC AUG CAC CAG GAC UGG CUC AAU GGC
 300
 lys glu phe lys cys arg val asn ser ala ala phe pro ala pro
 AAG GAG UUC AAA UGC AGG GUC AAC AGU GCA GCU UUC CCU GCC CCC
 310
 ile glu lys thr ile ser lys thr lys gly arg pro lys ala pro
 AUC GAG AAA ACC AUC UCC AAA ACC AAA GGC AGA CCG AAG GCU CCA
 320
 330
 340

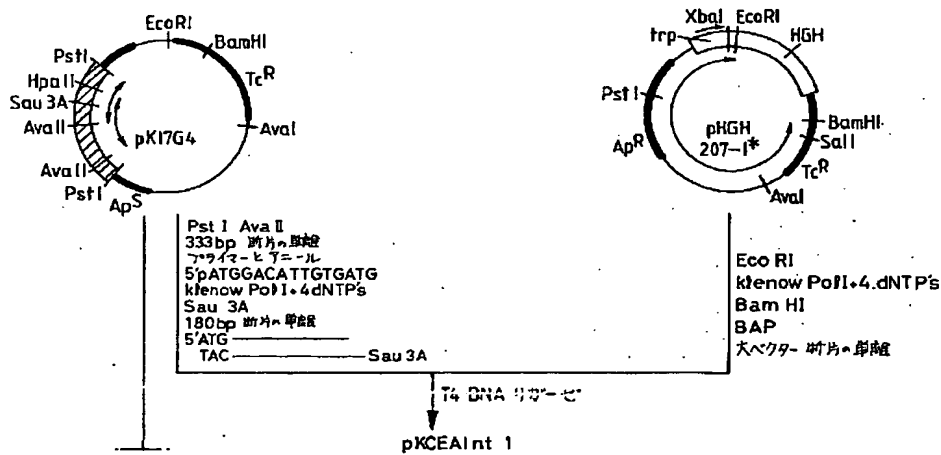
【図19】

350
 gln val tyr thr ile pro pro pro lys glu gln met ala lys asp
 CAG GUG UAC ACC AUU CCA CCU CCC AAG GAG CAG AUG GCC AAG GAU
 360
 lys val ser leu thr cys met ile thr asp phe phe pro glu asp
 AAA GUC AGU CUG ACC UGC AUG AUA ACA GAC UUC UUC CCU GAA GAC
 370
 ile thr val glu trp gln trp asn gly gln pro ala glu asn tyr
 AUU ACU GUG GAG UGG CAG UGG AAU GGG CAG CCA GCG GAG AAC UAC
 380
 390
 lys asn thr gln pro ile met asn thr asn gly ser tyr phe val
 AAG AAC ACU CAG CCC AUC AUG AAC ACG AAU GGC UCU UAC UUC GUC
 400
 tyr ser lys leu asn val gln lys ser asn trp glu ala gly asn
 UAC AGC AAG CUC AAU GUG CAG AAG AGC AAC UGG GAG GCA GGA AAU
 410
 420
 thr phe thr cys ser val leu his glu gly leu his asn his his
 ACU UUC ACC UGC UCU GUG UUA CAU GAG GGC CUG CAC AAC CAC CAU
 430
 440
 thr glu lys ser leu ser his ser pro gly lys OP
 ACU GAG AAG AGC CUC UCC CAC UCU CCU GGU AAA UGA UCCAGU6UCCU
 UGGAGCCUCUGGUCUACAGGACUCUGACACCUACCUCCACCCUCCUGUAUAAUAA
 AGCAGCCAGCACUGCCUUGGGAAAAA

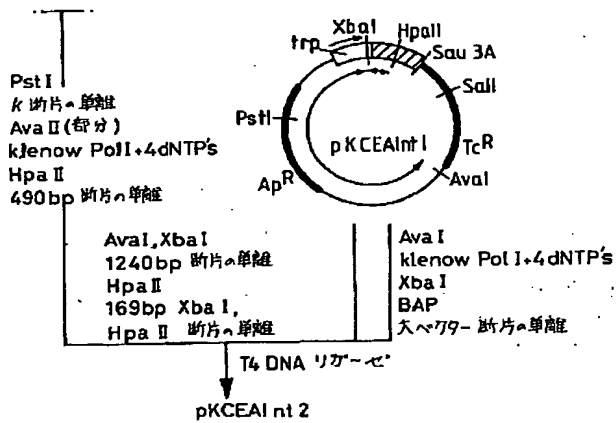
【図26】



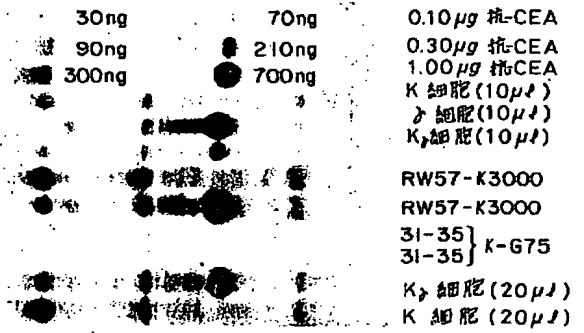
【図20】



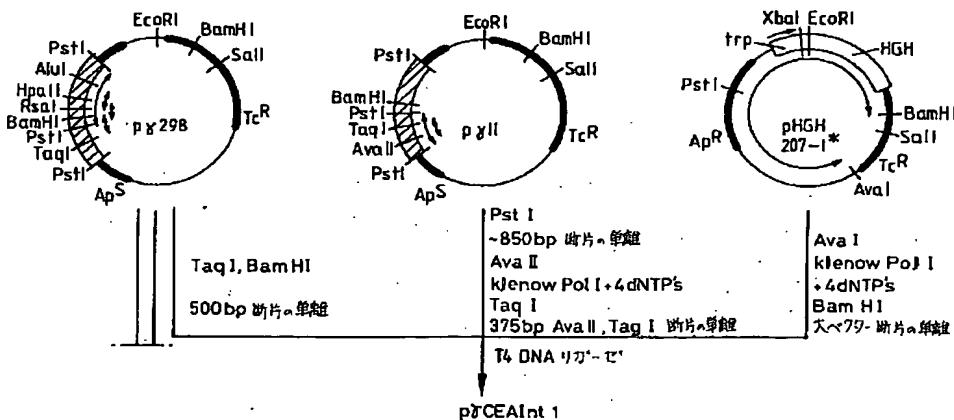
【図21】



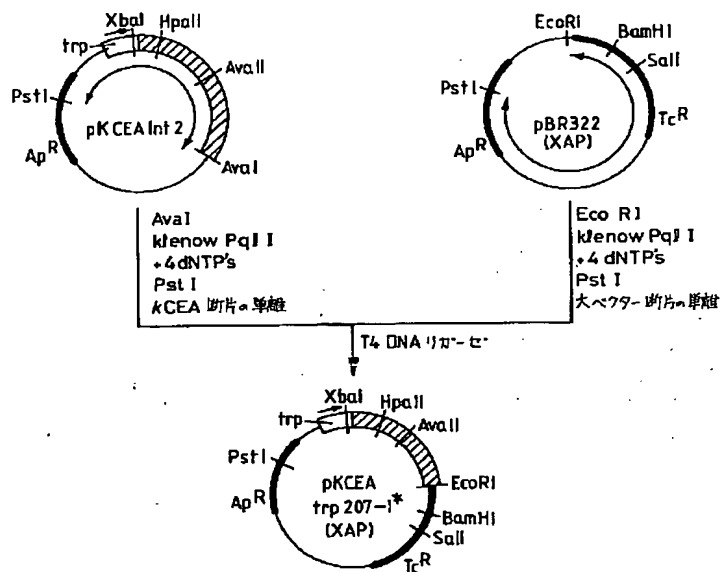
【図29】



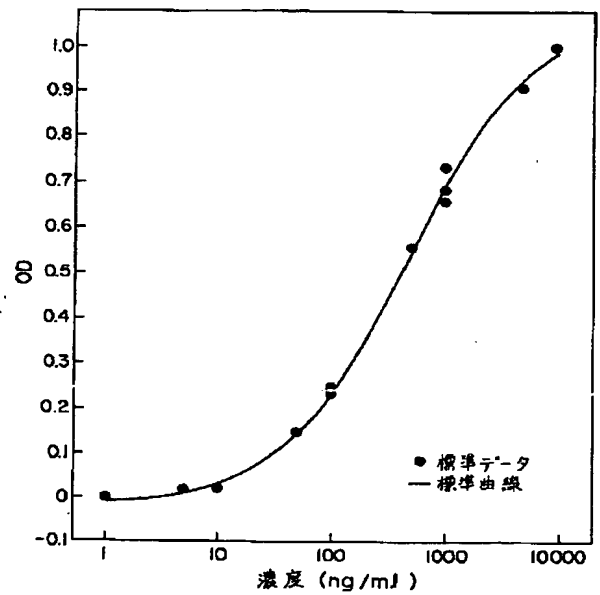
【図23】



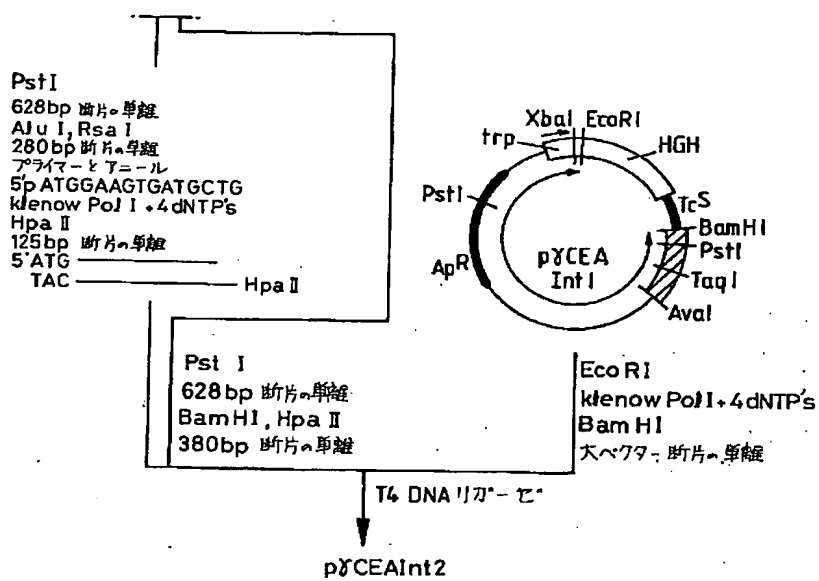
【図 2 2】



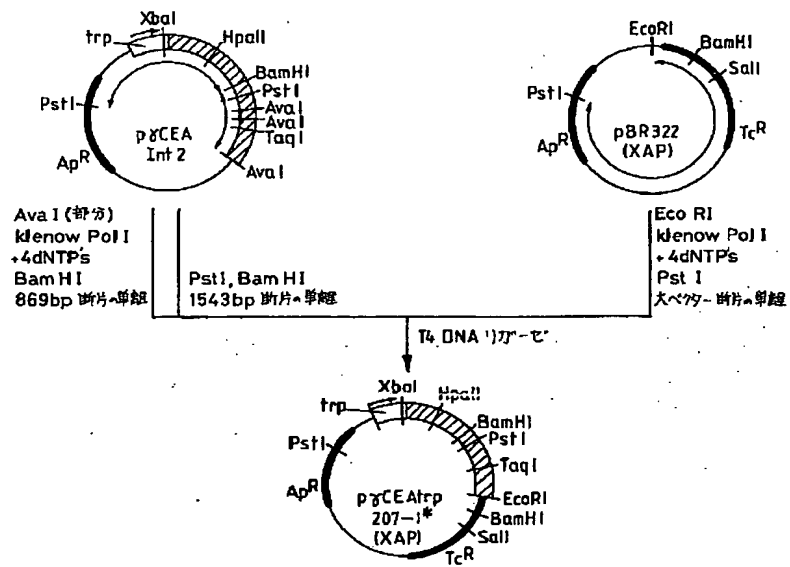
【図 3 0】



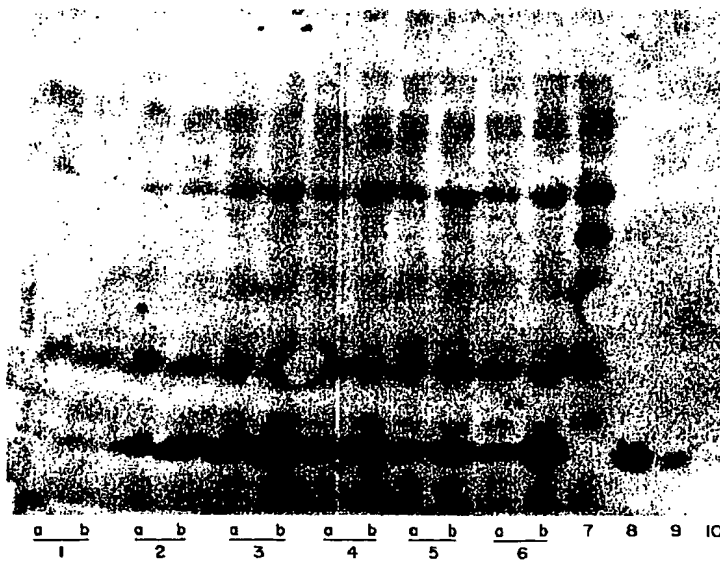
【図 2 4】



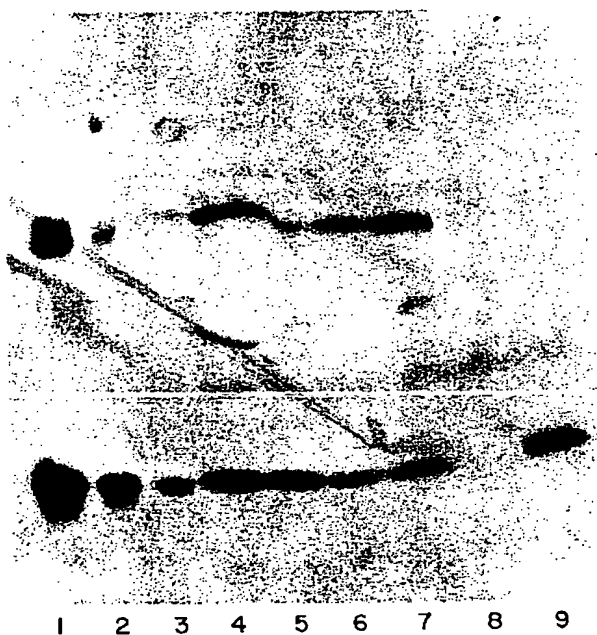
【図 25】



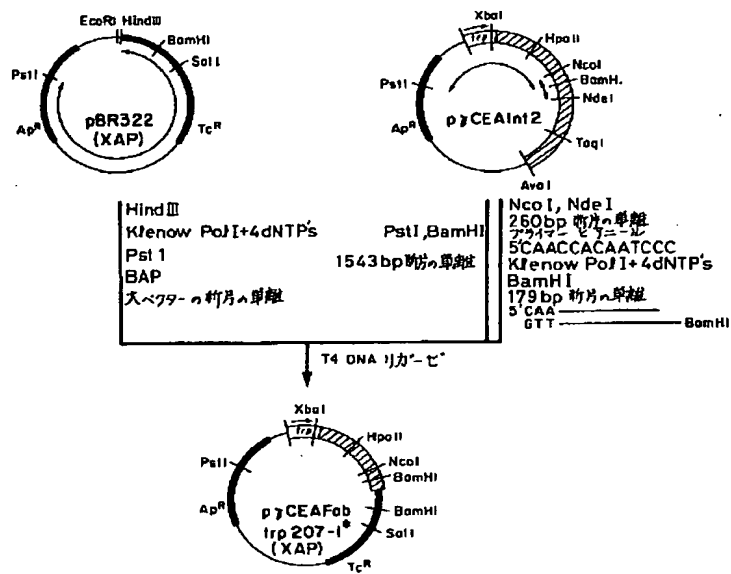
【図 27】



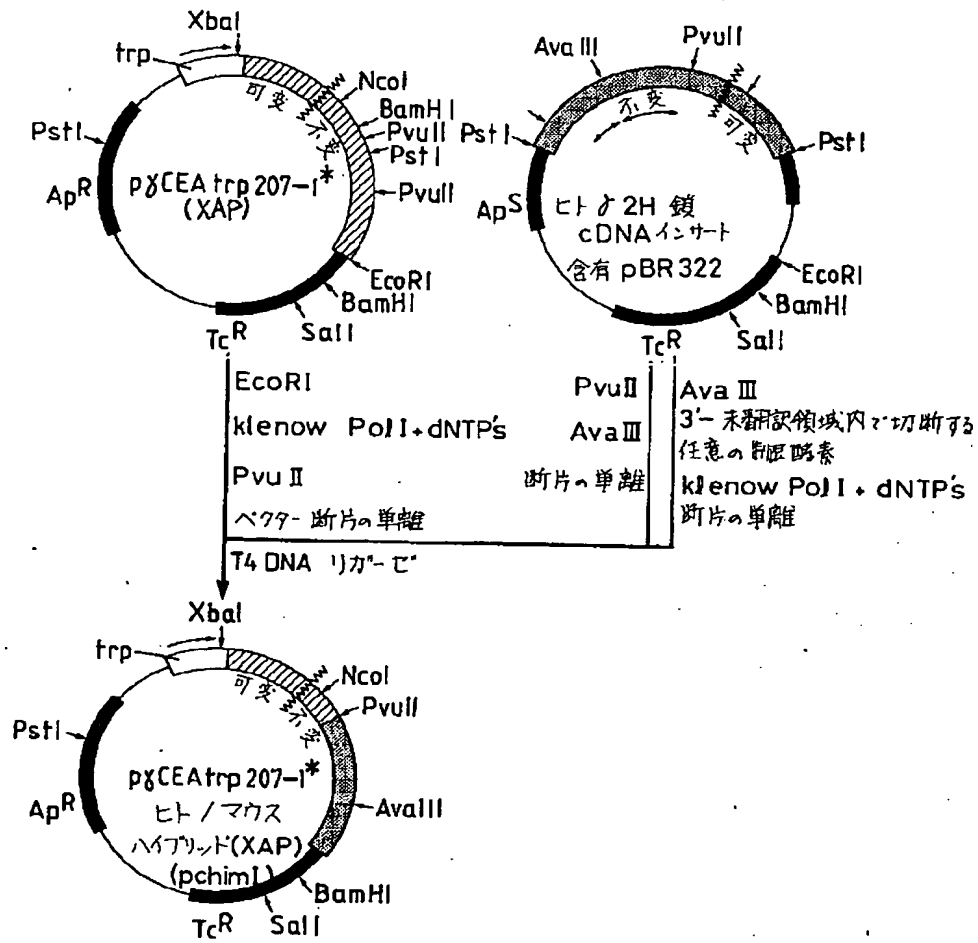
【図28】



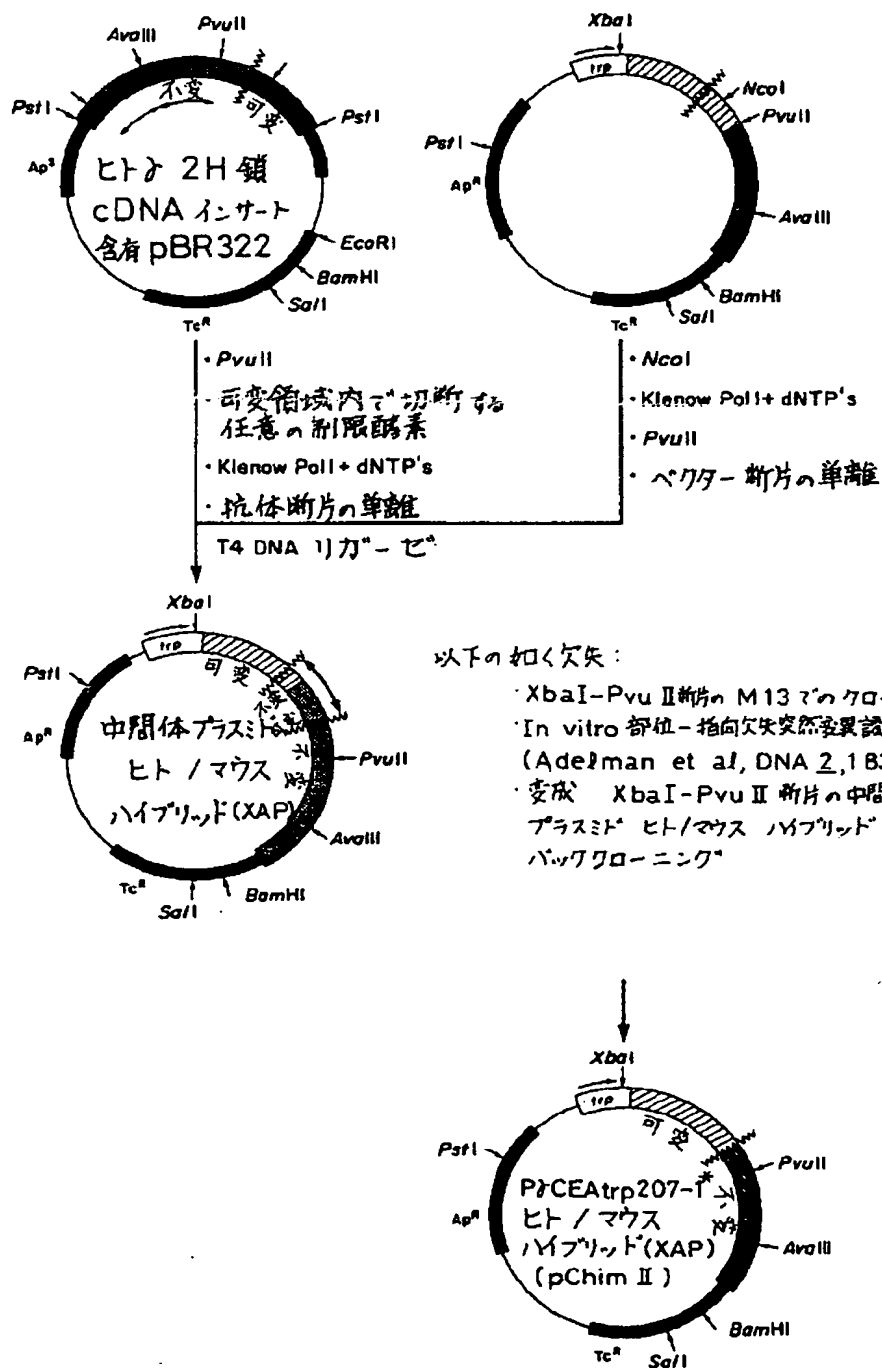
【図33】



【図31】



【図 3 2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

G O 1 N 33/531

A

// A 6 1 K 39/395

V

G O 1 N 33/577

B

(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)

(72)発明者 シュミュエル・カビリィ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91006、
アーカーディア、サウス・セカンド・アヴ
ェニュー・325
(72)発明者 ヘルベルト・ルイス・シンケル
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94010、
バーリンゲイム、イーストン・ドライヴ・
2621

(72)発明者 ウィリアム・エバンス・ホウムズ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94044、
パシフィカ、イーストレイク・29
(72)発明者 アーサー・デイル・リッグス
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91750、
ラ・ヴァーン、セント・アンドレス・アヴ
ェニュー・4852
(72)発明者 ロナルド・バーネル・ウェッゼル
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94127、
サン・フランシスコ、アーバノ・ドライ
ヴ・455